

# Funktionelle Dynamik des Retinalchromophors in verschiedenen Rhodopsinen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Mirka-Kristin Verhoefen  
aus Duisburg

Frankfurt 2010  
D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen

Dekan	Prof. Dr. Dieter Steinhilber
1. Gutachter	Prof. Dr. Josef Wachtveitl
2. Gutachter	Prof. Dr. Clemens Glaubitz
Datum der Disputation	28.10.2010

Für Sina, in tiefer Liebe und ewiger Verbundenheit.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Motivation</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Physikalische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich . . . . .	5
2.2	Infrarotspektroskopie . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Ultrakurzzeitspektroskopie</b>	<b>17</b>
3.1	Nichtlineare Optik . . . . .	17
3.2	Phasenanpassung in nichtlinearen Kristallen . . . . .	19
3.3	Erzeugung ultrakurzer Laserpulse . . . . .	21
3.4	Anreg-Abtast-Spektroskopie . . . . .	24
3.4.1	Transiente Absorption im sichtbaren Spektralbereich . . . . .	25
3.4.2	Transiente Absorption im mittelinfraroten Spektralbereich . . . . .	35
3.5	Fluoreszenz-Aufwärtskonvertierung . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Laserblitzlichtphotolyse</b>	<b>47</b>
4.1	Experimenteller Aufbau . . . . .	47
4.2	Datenevaluation . . . . .	50
4.3	Temperaturabhängige Messungen . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Tiefemperatur-Experimente</b>	<b>55</b>
5.1	Cryo-Trapping-Experimente im sichtbaren Spektralbereich . . . . .	56
5.2	Cryo-Trapping-Experimente im mittelinfraroten Spektralbereich . . . . .	58
5.3	Kombinierte IR/vis-Tiefemperaturexperimente . . . . .	60
<b>6</b>	<b>Bakteriorhodopsin als Referenzsystem</b>	<b>61</b>
6.1	Die Struktur . . . . .	61
6.2	Der Photozyklus . . . . .	63
<b>7</b>	<b>Der Photozyklus des bakteriellen Proteorhodopsins</b>	<b>71</b>
7.1	Einleitung . . . . .	71
7.2	pH-abhängige Isomerisierung des Retinalchromophors . . . . .	75
7.3	Die Primärreaktion der PR D97N-Mutante: Ein Modellsystem für PR bei pH 6 . . . . .	90
7.4	Einfluss des hochkonservierten Histidin-75 auf die Primärdynamik . . . . .	99

7.5	Tieftemperaturcharakterisierung des Proteorhodopsin-Photozyklus im Sichtbaren . . . . .	108
7.6	Tieftemperaturcharakterisierung des Proteorhodopsin-Photozyklus im Infraroten . . . . .	113
7.7	Resümee . . . . .	128
<b>8</b>	<b>Zeitaufgelöste Untersuchungen am eukaryotischen Retinalprotein</b>	
	<b>Channelrhodopsin-2</b>	<b>131</b>
8.1	Einleitung . . . . .	131
8.2	Retinalisomerisierung in Channelrhodopsin-2 . . . . .	133
8.3	Ultraschnelle Dynamik im infraroten Spektralbereich . . . . .	142
8.4	Die langsamen Schritte des ChR-2-Photozyklus und ihre Temperaturabhängigkeit . . . . .	153
8.5	Der Einfluss von Imidazol auf die Langzeitkinetik . . . . .	162
8.6	Resümee . . . . .	167
<b>9</b>	<b>Beeinflussung der Dynamik archaealer Retinalproteine</b>	<b>171</b>
9.1	Einleitung . . . . .	171
9.2	Der Einfluss von Azid auf die Primärdynamik . . . . .	175
9.3	Retinalisomerisierung im Sensorrhodopsin II-Transducer II-Komplex . . .	183
9.4	Resümee . . . . .	192
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>193</b>
10.1	Deutsche Fassung . . . . .	193
10.2	English version . . . . .	196
	<b>Eigene Publikationen</b>	<b>199</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>201</b>
	<b>Danksagungen</b>	<b>233</b>

# 1 Motivation

*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.*

Albert Einstein

Im Zuge der Evolution hat die Natur photoaktivierbare Proteine entwickelt, die es bewerkstelligen die Sonnenenergie in biochemisch nutzbare Energie umzuwandeln. Hierzu besitzen diese Proteine kleine Moleküle, sogenannte Chromophore, die die absorbierte Lichtenergie auf das Protein übertragen, was zur Aktivierung unterschiedlicher molekularer Prozesse führt. Herausstechende Systeme sind hierbei sicherlich die photosynthetischen Komplexe, Phototropine, Cryptochrome, Phytochrome sowie Retinalproteine.

Retinalproteine kommen in der Natur in allen drei Domänen des Lebens vor und erfüllen dort unterschiedlichste Funktionen. Vertebrata (Wirbeltiere) und Invertebrata (Wirbellose) besitzen in der Retina der Augen bzw. der Photorezeptoren das sogenannte Rhodopsin als primären Lichtrezeptor. Die Absorption von Photonen führt zur Aktivierung des G-Proteins Transducin und damit zur Auslösung der visuellen Signaltransduktion. Rhodopsin gehört entsprechend zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die die größte und vielseitigste Gruppe von Membranrezeptoren darstellt [1–6]. Neben Rhodopsin sind in den letzten Jahren weitere Retinalproteine in Eukaryoten wie Pilzen (*Neurospora* Rhodopsin) [7], Dinoflagellaten [8], Cryptomonaden [9] und Grünalgen gefunden worden. Besonderes Aufsehen erregte dabei die Entdeckung der Retinal-basierten Ionenkanäle Channelrhodopsin-1 und -2 aus dem Augenfleck der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* [10, 11]. Die Durchlässigkeit für ein- und zweiwertige Kationen bietet unmittelbar die Möglichkeit in nicht-invasiver Weise durch Licht direkt Zellen oder intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-abhängige Prozesse anzuregen. Mittlerweile wird ChR-2 zur optogenetischen Kontrolle neuronaler Zellen genutzt [12–15].

Im Gegensatz zu den eukaryotischen Rhodopsinen leben archaebakterielle Retinalproteine unter weit widrigeren Umständen. Die seit dem Erdaltertum existierenden Archaeen haben sich durch spezifische Anpassungsstrategien in Habitaten wie austrocknenden Salzseen und Küstenstreifen sowie Salinen durchgesetzt, wo sie neben den hohen Salzkonzentrationen intensiver Sonnenstrahlung ausgesetzt sind [16–19]. Die vorherrschenden Sauerstoffmangelbedingungen führten wahrscheinlich dazu, dass die Halobakterien eine eigene Art der Photosynthese entwickelten. Kernstück dieser Energiekonversionsmaschine ist das Retinalprotein Bakteriorhodopsin. Mit bis dato über 4000 Publikationen (Web of Knowledge, Titel-Stichwortsuche “Bakteriorhodopsin”) ist Bakteriorhodopsin eines der

bestuntersuchten Transmembranproteine. Als lichtgetriebene Protonenpumpe erzeugt es einen Protonengradienten über die Zellmembran, der von einer  $F_1F_0$ -ATP-Synthase zur Generierung des Energiespeichers Adenosintriphosphat (ATP) genutzt wird [16, 20, 21]. Der Wirkungsgrad der Energieumwandlung liegt dabei im Bereich der pflanzlichen Photosynthese. Unterstützt wird das ganze System dadurch, dass Halobakterien wie der Organismus *Halobacterium salinarum* zwei sensorische Retinalproteine besitzen, die über die Ankopplung an eine Geißel Phototaxis betreiben. Hierbei bewegen sich die Zellen vermittelt über die Sensorproteine Sensorrhodopsin I und II zu gelb-orange-farbenem Licht hin (negative Phototaxis), während sie von Licht im ultravioletten, oder blauen Spektralbereich wegschwimmen [22, 23]. Das vierte Retinalprotein Halorhodopsin dient der osmotischen Balance der Zelle [24–26].

Während die ersten Rhodopsine der eukaryotischen und archaealen Domäne schon seit den späten 1970er Jahren bzw. frühen 1980er Jahren bekannt sind, wurde mit Proteorhodopsin das erste bakterielle Retinalprotein erst im Jahre 2000 entdeckt [27, 28]. Unter anderem durch Shotgun-Sequencing-Verfahren [29] konnten mittlerweile über 800 Proteorhodopsin Varianten entdeckt werden. Als vektorielle Protonenpumpe stellt Proteorhodopsin ähnlich wie Bakteriorhodopsin einen elektrochemischen Gradienten zur Verfügung, der zur Energiegewinnung oder für andere Prozesse genutzt werden kann [30, 31]. Da sich aber die Richtung des Protonentransports bei einem pH-Wert von etwa 7 umkehrt, ist die Frage nach der ursprünglichen Funktion der Proteorhodopsine im Meerwasser (pH-Wert  $\approx 7$ ) ungeklärt. Diskutiert wird unter anderem, ob sie als Photosensoren dienen können oder eine regulatorische Rolle einnehmen. Mit *Anabaena* Sensorrhodopsin wurde 2003 das erste prokaryontische Sensor-Retinalprotein entdeckt [32]. Es weist eine hohe Ähnlichkeit zu den archaealen Sensorrhodopsinen auf. Photobiologische Studien lassen vermuten, dass *Anabaena* Sensorrhodopsin ein photochromer Farbensensor ist [33].

Kennzeichnend für alle genannten Retinalproteine ist das gemeinsame heptahelikale Transmembranmotiv [33–37]. Der Chromophor ist dabei kovalent über eine Schiffbase an die Seitenkette eines Lysins gebunden. Gestartet werden alle meist zyklischen Reaktionen durch die lichtgesteuerte Isomerisierung des Retinals. In der Vielzahl der Fälle wird dabei die Isomerisierung von der all-*trans*-Konfiguration in die 13-*cis*-Konfiguration beobachtet, selten aber auch 11-*cis* nach all-*trans* (Rhodopsin). Für das Verständnis der biochemischen Prozesse der Retinalproteine spielt die Dynamik der Primärreaktion sowie die Wechselwirkung zwischen Chromophor und Protein eine zentrale Rolle. Gegenstand dieser Arbeit ist es daher die lichtgesteuerten Prozesse in unterschiedlichen Rhodopsinen und auf unterschiedlichen Zeitskalen zu untersuchen.

Dies scheint mit modernster Laserspektroskopie ein relativ einfaches Unterfangen zu sein. Man sollte aber nicht vergessen, dass die heute zur Verfügung stehenden Methoden das Ergebnis einer über Jahrzehnte andauernden intensiven Forschung und komplexen Entwicklung sind, deren herausragendste Arbeiten mit Chemie- bzw. Physik-Nobelpreisen geehrt wurden. Für “grundlegende Arbeiten auf dem Gebiet der Quantenelektronik, die zur Konstruktion von Oszillatoren und Verstärkern auf der Basis des Maser-Laser-Prinzips führten” wurden Townes, Bassow und Prochorow bereits 1964 mit dem Physik-

---

Nobelpreis ausgezeichnet [38]. Für die Anwendung dieser Technik in Form von ersten Blitzlichtphotolysemessungen zu “Untersuchungen von extrem schnellen chemischen Reaktionen” bekamen Eigen, Norrish und Porter drei Jahre später den Chemie-Nobelpreis [39]. Auch das weitere Voranschreiten auf diesem Gebiet wurde ausgezeichnet. 1981 erhielten Bloembergen und Schawlow den Physik-Nobelpreis “für ihren Beitrag zur Entwicklung der Laserspektroskopie” [40]. Zu dieser Zeit hätten wahrscheinlich die wenigsten geglaubt, dass man in Kürze auch Reaktionen mit einer Zeitauflösung von wenigen Femtosekunden messen können würde und somit chemische Reaktionen wie Bindungsbrüche oder auch Isomerisierungen direkt beobachtbar werden. Zewail wurde “für seine Studien des Übergangszustands chemischer Reaktionen mit Hilfe der Femtosekundenspektroskopie” 1999 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet [41]. Die weitere Verfeinerung der Femtosekundenspektroskopie und ihrer Nebendisziplinen führte dazu, dass es heutzutage hochpräzise Lasertechniken gibt. Unter anderem für die Entwicklung des “optischen Frequenzkamms” erhielten Hänsch und Hall 2005 den Nobelpreis in Physik [42]. Diese Aufzählung zeugt von der Wichtigkeit, photophysikalische und photochemische Prozesse verstehen zu lernen. Die aus den zeitaufgelösten Studien gewonnenen Erkenntnisse sind nicht zuletzt bei biologischen Systemen wie den Retinalproteinen eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung zukünftiger Technologien. Für das bereits gut untersuchte Bakteriorhodopsin gibt es mittlerweile mehrere kommerzielle Anwendungsgebiete [43].



## 2 Physikalische Grundlagen

*Phantasie ist wichtiger als Wissen,  
denn Wissen ist begrenzt.*

————— *Albert Einstein*

Die Beobachtung der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung und Materie durch Änderung des Lichtspektrums bezeichnet man allgemein als Spektroskopie. Man unterscheidet hierbei zwischen elastischer Streuung (Beugungsexperimente), inelastischer Streuung (Raman-Spektroskopie) und resonanter Absorption bzw. Emission von Photonen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem letzten Teilgebiet und beschränkt sich auf zeitaufgelöste und statische Betrachtungen des ultravioletten, sichtbaren und mittelinfraroten Spektralbereichs. Die Grundlagen hierfür sollen in den nachfolgenden zwei Unterkapiteln dargestellt werden. Die Inhalte wurden den relevanten Lehrbüchern entnommen [44–48].

### 2.1 Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich

In den Naturwissenschaften steht der Begriff des Lichts für das gesamte elektromagnetische Wellenspektrum. Dieses ist über die Wellenlänge definiert und über die nachfolgende Beziehung mit der Frequenz und der Energie der Photonen verknüpft.

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.1)$$

$c$  entspricht der Lichtgeschwindigkeit ( $2,99 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$ ) und  $h$  dem Planckschen Wirkungsquantum ( $6,63 \cdot 10^{-34} Js$ ). Dem fürs Auge sichtbaren Bereich von 750 nm - 400 nm schließt sich der ultraviolette (UV) Bereich an. Diesen unterteilt man aufgrund unterschiedlicher biologischer Wirkungen in UV-A (400 nm - 320 nm), UV-B (320 nm - 280 nm) und UV-C (280 nm - 10 nm).

Die Absorption von elektromagnetischen Wellen des ultravioletten und sichtbaren Spektralbereichs führt zur Anregung eines Valenzelektrons. Ein Übergang findet immer dann statt, wenn das Übergangsdipolmoment  $\mu_{EA}$ , definiert als

$$\mu_{EA} = \int \psi_E \mu \psi_A d\tau, \quad (2.2)$$

ungleich Null ist.  $\psi_A$  und  $\psi_E$  sind hier die Wellenfunktionen des Anfangs- und Endzustands. Es ist daher ein Maß für die Stärke der Kopplung zwischen elektronischem

Übergang und elektromagnetischem Feld. Das Elektron wird in den elektronisch angeregten Zustand angehoben. Der Übergang findet nach dem *Franck-Condon-Prinzip* vertikal statt. Neben der Regel, dass sich das Übergangsdipolmoment beim Übergang ändern muss, gibt es noch weitere Auswahlkriterien für das Auftreten von elektronischen Übergängen, die sich auf die Erhaltung des Drehimpulses zurückführen lassen. Es gilt zum einen das Spin-Verbot, das besagt, dass sich die Multiplizität, definiert als  $M = 2S + 1$ , während des Übergangs nicht ändern darf. Dies bedeutet, dass ein Singulett-Grundzustandselektron nur in einen angeregten Zustand mit Singulettcharakter angehoben werden darf. Zum anderen gilt die *Regel von Laporte*. Diese besagt, dass Elektronenübergänge zwischen Orbitalen gleicher Parität untersagt sind. Zudem gibt es Fälle, in denen sich die beim Elektronenübergang beteiligten Orbitale nicht oder nur wenig überlappen (Charge-Transfer-Übergänge,  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge bei Carbonylverbindungen). Auch hier wird der elektronische Übergang nicht beobachtet. Die Übergangswahrscheinlichkeit oder auch Oszillatorstärke eines Übergangs hängt vom Quadrat des Übergangsdipolmoments ab.

$$I \propto |\mu|^2 \quad (2.3)$$

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Intensität der beobachteten Absorption im Spektrum gegeben durch den Quotienten aus der einfallenden ( $I_0$ ) und der austretenden Strahlung ( $I$ ). Die Absorption ist wiederum abhängig von der Konzentration der Probe  $c$ , dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  sowie der Weglänge der Strahlung durch die Probe (Schichtdicke)  $d$ .

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.4)$$

Ein Absorptionsspektrum ist definiert als die wellenlängenabhängige Absorption. Aufgrund der Energiebreite der elektronischen Niveaus erhält man ein Bandenspektrum, das durch Lage, Intensität und Feinstruktur charakterisiert ist.

### Klassifizierung elektronischer Übergänge

Elektronenübergänge lassen sich mit Hilfe der beteiligten Molekülorbitale (MO) einteilen. Es finden Übergänge aus besetzten bindenden  $\sigma$ - und  $\pi$ -Orbitalen sowie nichtbindenden  $n$ -Orbitalen in leere, antibindende  $\sigma^*$ - bzw.  $\pi^*$ - Orbitale statt. Sie werden entsprechend mit  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$  oder  $n \rightarrow \pi^*$  bezeichnet. Die Absorptionsbande kann je nach Lage einer ganz bestimmten charakteristischen Gruppe eines Moleküls (bspw. Carbonylgruppe) bzw. dem ganzen Molekül (bspw. Polyen) zugeordnet werden. Man bezeichnet diese dann auch als Chromophore (griech.: Farbträger). Die Lage wird jedoch durch sterische, induktive und mesomere Effekte stark beeinflusst. In flüssiger Phase hat auch das Lösungsmittel aufgrund seiner Wirkung als Dipol einen charakteristischen Einfluss auf die Lage der Absorptionsbanden. Langwellige Verschiebungen einer Absorption bezeichnet man als bathochrom, eine kurzwellige Verschiebung als hypsochrom.

Weiterhin sind die d-d-Übergänge von Übergangsmetallkomplexen aufgrund der geringen Aufspaltung des Ligandenfeldes im sichtbaren Spektralbereich angesiedelt. Sie sind für viele charakteristische Farben in Komplexverbindungen verantwortlich. Neben diesen Übergängen beobachtet man noch Charge-Transfer-Übergänge, bei denen durch Absorption Elektronen aus Ligandenorbitalen in Zentralatomorbitale (oder auch umgekehrt) übergehen. Aufgrund der großen räumlichen Verschiebung ist das Übergangsdipolmoment sehr groß und die Absorptionsbande häufig sehr intensiv.

### Die Deaktivierung angeregter Zustände

Nach Anregung kann ein Elektron im angeregten Zustand seine Energie auf verschiedene Arten wieder abgeben. Am häufigsten erfolgt die Energieabgabe durch strahlungslose Deaktivierung, bei der das Molekül seine elektronische Energie in Rotations-, Schwingungs- und Translationsenergie der umgebenden Moleküle umwandelt. Eine weitere Möglichkeit, die Anregungsenergie wieder abzugeben, ist die Teilnahme an einer chemischen Reaktion, Energieübertragung oder Elektronentransferreaktion. Die dritte Möglichkeit liegt schließlich in der strahlenden Deaktivierung, bei der das angeregte Elektron seine überschüssige Energie in der Form von Photonen wieder abstrahlt. Man unterscheidet hierbei zwei Prozesse: Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

Bei der Fluoreszenz erfolgt die strahlende Deaktivierung durch spontane Emission. Spontane Emission bezeichnet die Emission eines Photons beim Übergang eines Elektrons von einem höheren in ein tieferes Energieniveau. Die Fluoreszenz-Banden von Molekülen sind meist relativ zu den Absorptionsbanden zu größeren Wellenlängen verschoben. Diese Verschiebung nennt man Stokes-Verschiebung. Den Prozess der Phosphoreszenz beob-

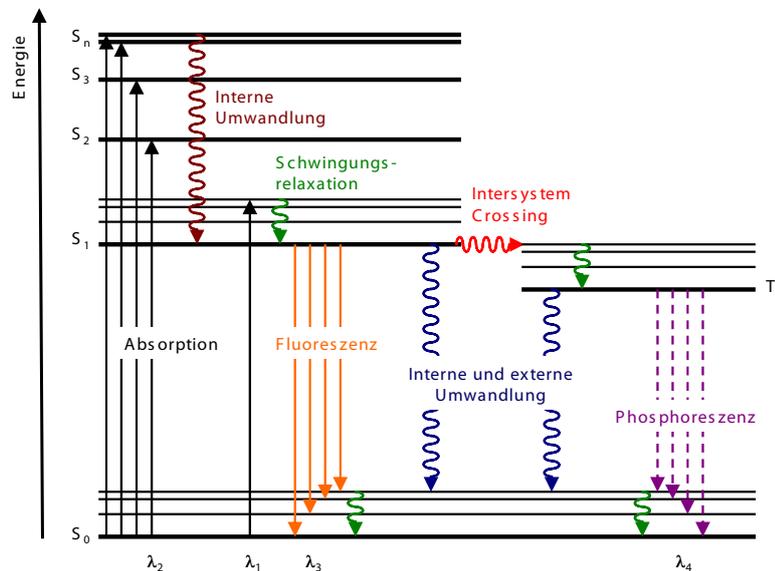


Abbildung 2.1: Jablonski Diagramm zur Beschreibung der Prozesse nach elektronischer Anregung.

achtet man, nachdem das angeregte Elektron seinen Spin umkehrt. Hiermit verbunden ist eine Änderung der Multiplizität, in Abbildung 2.1 von angeregtem Singulettzustand ( $\uparrow\downarrow$ ) zum Triplettzustand ( $\uparrow\uparrow$ ). Man bezeichnet diesen Prozess als Intersystem Crossing oder Interkombination. Die Wahrscheinlichkeit der Interkombination wird durch überlappende Schwingungsniveaus beider Zustände erhöht. Obwohl Spinumkehr nicht erlaubt ist, kann diese Auswahlregel durch eine starke Spin-Bahn-Wechselwirkung, wie man sie bei Gegenwart eines schweren Atoms beobachtet, gebrochen werden. Dem Intersystem Crossing folgt durch interne oder externe Umwandlungen oder durch Phosphoreszenz das Erreichen des elektronischen Grundzustandes. Der Übergang ist jedoch wiederum mit einer Spinumkehr verbunden und deshalb optisch verboten. Dies ist der Grund, warum Phosphoreszenz auch sehr langlebig ist. Alle beschriebenen Prozesse können in einem Jablonski-Diagramm veranschaulicht dargestellt werden (Siehe Abbildung 2.1).

## 2.2 Infrarotspektroskopie

Infrarotes Licht deckt der Definition nach einen Spektralbereich von  $0,75 \mu\text{m}$  bis  $1000 \mu\text{m}$  ab. Absorbiert ein Molekül einen Lichtquant dieser Wellenlänge, so werden Molekülschwingungen und -rotationen induziert. Der Infrarotbereich wird im allgemeinen in drei Teilgebiete unterteilt: nahes Infrarot (n-IR), mittleres Infrarot (m-IR) und fernes Infrarot (f-IR). Da es in der Infrarotspektroskopie üblich ist die Wellenzahl  $\tilde{\nu}$ , definiert als

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (2.5)$$

statt der Wellenlänge anzugeben, wird diese Größe im folgenden benutzt.

	$\lambda/\mu\text{m}$	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$
n-IR	0,75 - 3	13000 – 3300
m-IR	3 - 30	3300 – 330
f-IR	30 - 1000	330 – 10

**Tabelle 2.1:** Spektralbereiche des infraroten Spektrums.

Im n-IR beobachtet man die Oberton- bzw. Kombinationsschwingungen der Grundschwingungen, die im m-IR angesiedelt sind. f-IR-Spektroskopie beschäftigt sich mit Molekülrotationen sowie Gerüstschwingungen.

Das einfachste theoretische Modell zur Beschreibung der Schwingung eines Moleküls ist der *harmonische Oszillator*. In diesem Modell werden die Atome als Massenpunkte beschrieben, die durch masselose elastische Federn, die die Bindungen repräsentieren, zusammengehalten werden. Für die Bindungen gilt das Hookesche Gesetz, das besagt, dass die wirkende Kraft  $F$  der Auslenkung  $x$  proportional ist. Die Proportionalitätskonstante ist die Kraftkonstante  $k$ .

$$F = -k \cdot x \quad (2.6)$$

Ausgehend vom Newtonschen Kraftgesetz und unter Berücksichtigung der reduzierten Masse  $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$  erhält man die eindimensionale Beschreibung des harmonischen Oszillators.

$$\mu \cdot \frac{d^2 x}{dt^2} + k \cdot x = 0 \quad (2.7)$$

Die zeitabhängige Lösung dieser Differentialgleichung

$$x(t) = x_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu \cdot t) \quad (2.8)$$

ergibt eine periodische Funktion mit der Schwingungsfrequenz  $\nu$ , die durch folgende Gleichung gegeben ist:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.9)$$

Die quantisierten Schwingungsenergieeigenwerte können mit Hilfe der Schrödingergleichung berechnet werden. Für den linearen harmonischen Oszillator erhält man sie in folgender Form:

$$E = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad (2.10)$$

$h$  ist hierbei das Plancksche Wirkungsquantum und  $v$  die Schwingungsquantenzahl  $v = 0, 1, 2, 3 \dots$

Der durch diese Gleichung beschriebene Oszillator besitzt mit  $v = 0$  die Nullpunktsenergie  $E_0 = \frac{1}{2}h\nu$ , was bedeutet, dass die Atome nie ohne Relativbewegung zueinander sind und ein Molekül daher immer in einem gewissen Ausmaß schwingt. Die Schwingungsenergieniveaus weisen äquidistante Abstände auf. Ein Übergang ist aber nur dann beobachtbar, wenn hiermit eine Änderung des Dipolmoments verbunden ist. Gemäß der Auswahlregeln sind nur Übergänge erlaubt, die  $\Delta v = \pm 1$  erfüllen.

Tatsächlich beschreibt der harmonische Oszillator aber zwei wesentliche Effekte realer Moleküle nur ungenügend. Zum einen werden die starken elektrostatischen Abstöße bei Annäherung der positiv geladenen Atomkerne nicht berücksichtigt, zum anderen wird die Dissoziation des Moleküls bei Vergrößerung der Bindung außer Acht gelassen. Besser beschrieben werden diese Eigenschaften durch das Modell des *anharmonischen Oszillators*. Für die beschriebene Potentialkurve gibt es keine theoretisch ableitbare analytische Form. Der Kurvenverlauf wird aber in guter Näherung durch die nach P. M. Morse benannte empirische Funktion wiedergegeben:

$$E = D_{eq} [1 - \exp(\beta(r_{eq} - r))]^2 \quad (2.11)$$

$D_{eq}$  ist die Dissoziationsenergie und die Konstante  $\beta$  ist gegeben durch:

$$\beta = \tilde{\nu}_0 \sqrt{\frac{2\pi^2 c \mu}{D_e h}} \quad (2.12)$$

Als Konsequenz sind die Energieniveaus nicht mehr äquidistant, sondern verringern sich zur Dissoziationsgrenze hin. Zudem sind Übergänge mit  $\Delta v = \pm 2, 3, 4$  erlaubt, die im Spektrum im n-IR-Bereich als Obertonschwingungen der zwei- bis n-fachen Frequenz der Grundschiwingung beobachtet werden.

### Normalmoden

Betrachtet man ein Molekül mit  $N$  Atomen, so hat aufgrund der Unabhängigkeit der drei Raumkoordinaten jedes Atom  $3N$  Freiheitsgrade. Hiervon entfallen drei auf die translatorischen Bewegungen und im Falle nichtlinearer Moleküle weitere drei auf die Rotation. Lineare Moleküle haben zwei rotatorische Freiheitsgrade, da das Trägheitsmoment der Molekülachse 0 ist. Ein nichtlineares Molekül besitzt daher  $3N - 6$  Grundschiwingungen, ein lineares  $3N - 5$  Schwingungen. Diese werden als Normalschwingungen oder auch Normalmoden bezeichnet. Je nach Schwingungsform unterscheidet man hier zwischen Valenzschwingungen ( $\nu$ ), die die Änderung von Bindungslängen beschreiben sowie Deformationsschwingungen ( $\delta$ ), die von einer Änderung der Bindungswinkel bei annähernd konstantem Bindungsabstand ausgehen. Die Deformationsschwingungen werden weiterhin in ebene (“in plane”) und unebene (“out of plane”) Deformationsschwingungen eingeteilt, die wiederum unterklassifiziert werden in Spreiz- (“bending”), Pendel- (“rocking”), Torsions- (“twist”) und Kippschwingung (“wagging”). Zusätzlich teilt man noch nach dem Symmetrieverhalten ein. So bezeichnet man Schwingungen, die unter vollständigem Erhalt der Molekülsymmetrie ablaufen als symmetrische Schwingungen und Schwingungen, die unter Verlust eines oder mehrerer Symmetrieelemente stattfinden, als antisymmetrisch. Da Makromoleküle aus einer großen Anzahl von Atomen bestehen, bedingt dies mehrere hundert bis tausend Normalschwingungen, welche jeweils bei einer speziellen Frequenz absorbieren. Die Abhängigkeit der Frequenzen von der Temperatur und der Umgebung, wie z.B Lösungsmittel, zeigt die Schwierigkeit der Interpretation der Fülle der Informationen eines Infrarotspektrums. Dennoch ist es gerade oberhalb von  $1500 \text{ cm}^{-1}$  möglich, charakteristische Einzelbindungen oder funktionelle Gruppen eines Moleküls zu beobachten. Unterhalb von  $1500 \text{ cm}^{-1}$  ist dies dadurch erschwert, dass sich die dort absorbierenden Gerüstschwingungen eines Moleküls häufig überschneiden, sodass man die beobachteten Banden nicht mehr auf Normalschwingungen zurückführen kann. Zudem beobachtet man in diesem Spektralbereich auch Kombinations- und Oberschwingungen. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich dadurch, dass neben den Lösungsmitteln auch das in der Luft enthaltene  $\text{CO}_2$  ( $\nu_{as}$  bei  $2349 \text{ cm}^{-1}$ ) sowie Wasserdampf (Rotationsschwingungsbanden von  $1800 \text{ cm}^{-1}$  bis  $1400 \text{ cm}^{-1}$ ) sehr starke Absorptionsbanden aufweisen. Diese lassen sich aber durch Trockenluftspülung kontrollieren. Um die Informationen aus einem Spektrum herauszuarbeiten, ist man dazu übergegangen sogenannte Differenz-

Spektroskopie zu betreiben. Dies bedeutet, dass man vor Initiierung einer Reaktion ein sogenanntes Referenzspektrum des Ausgangszustands misst, das von den Produktspektren abgezogen wird. Man erhält so nur Informationen über Schwingungsbanden, die sich geändert haben. Negative Banden entsprechen im Differenzspektrum Banden des nun gebleichten Ausgangszustands, positive Banden sind gleichbedeutend mit Produktbanden. Differenzbanden können zudem durch Verschiebung der Bandenposition entstehen. Durch eine zeitaufgelöste Aufzeichnung der Bildung und des Zerfalls der Schwingungen kann man die Reaktion verfolgen und reaktive Intermediate identifizieren.

## Infrarotspektroskopie an Proteinen

Die Bedeutung der Infrarotspektroskopie für die Aufklärung biologischer Reaktionen hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen, da mit dieser Technik Aussagen über die Struktur, die Umgebung des Proteinerückgrats und der Seitenketten sowie über Modifizierungen chemischer Gruppen getroffen werden können. Zudem ist es durch die Entwicklungen der letzten 15 Jahre auf dem Gebiet der Kurzzeit-Infrarotspektroskopie möglich, Dynamiken in einem Zeitbereich von wenigen 100 fs bis hin zu Sekunden schwingungsspektroskopisch zu untersuchen.

Strukturelle Einblicke in ein Protein bekommt man über die Schwingungsbanden des Peptidrückgrats. Betrachtet man eine freie, planare Peptidgruppe, so erhält man 9 zugeordnete Schwingungsmoden, die als Amid A, Amid B, sowie Amid I-Amid VII bezeichnet werden. Die Zusammensetzung dieser Schwingungen ist in Tabelle 2.2 aufgelistet.

	Bandenposition in H <sub>2</sub> O / cm <sup>-1</sup>	Zuordnung
Amid A und B	3300 / 3070	$\nu$ N-H
Amid I	1650	$\nu$ C=O
Amid II	1550	$\nu$ C=N, $\delta$ N-H
Amid III	1400 - 1200	$\nu$ C=N, $\delta$ N-H, in phase
Amid IV - VII	< 1000	CO, CC, NH, CNC

**Tabelle 2.2:** Zuordnung der Amidmoden.

Die größte Bedeutung für die Analyse von Proteinstrukturen haben die Amid I- und Amid II-Banden. Die Amid I-Schwingung zwischen 1630 cm<sup>-1</sup> und 1690 cm<sup>-1</sup> besteht zu etwa 80% aus der C=O-Valenzschwingung der Peptidcarbonylgruppe. Die Lage und die Intensität der Absorptionsbande korrelieren mit den  $\psi$ - und  $\phi$ -Winkel des Rückgrates und damit der Sekundärstruktur des Proteins. Tabelle 2.3 veranschaulicht dies. Besonders auffällig ist, dass sich die Amid I-Bande in  $\beta$ -Faltblattstrukturen in zwei Banden aufspaltet. Dies resultiert der Literatur nach [49, 50] aus einer Übergangsdipolmomentkopplung (engl.: transition dipole coupling). Erschwert wird die Analyse der Amid I-Bande dadurch, dass sie von einer starken Wasserbande überlagert wird. Proteine werden daher häufig in schwerem Wasser (D<sub>2</sub>O) untersucht. Dabei verändert ein sogenannter H/D-Austausch durch die veränderte Masse der schwingenden Atome

Sekundärstruktur	Bandenposition in $\text{H}_2\text{O} / \text{cm}^{-1}$
$\alpha$ -Helix	1648 - 1657
$\beta$ -Faltblatt	1623 - 1641
	1674 - 1695
Schleifen	1662 - 1686
ungeordnete Knäuel	1642 - 1657

**Tabelle 2.3:** Amid I-Moden verschiedener Strukturelemente. (Nach Goormaghtigh et al. [51, 52])

die Schwingungsfrequenzen und damit die Lage der Absorptionsbanden im Spektrum. Für die Amid I-Bande liegen diese Verschiebungen abhängig von der Struktur bei 4-10  $\text{cm}^{-1}$ . Die Amid II-Bande zeigt hingegen eine größere Sensitivität bezüglich H/D-Austauschexperimenten und wird um etwa 100  $\text{cm}^{-1}$  verschoben. Hierbei ändert sich aber nicht nur die Lage der Bande, sondern auch die Zusammensetzung der Mode. Während sich die Amid II-Bande in  $\text{H}_2\text{O}$  aus 40-60% N-H-Biegeschwingung, 18-40% C-N-Streckschwingung und ca. 10% C-C-Streckschwingung zusammensetzt, enthält sie in  $\text{D}_2\text{O}$  keine Anteile der N-D-Biegeschwingung [51]. Sie wird daher dann auch Amid II'-Bande genannt. Das beschriebene Schieben der Amid II-Mode wird häufig eingesetzt um den Deuterierungsgrad eines Proteins zu bestimmen. Im Falle strukturselektiver, unterschiedlicher H/D-Austauschraten können auch Aussagen über die räumliche Lage der Sekundärstrukturelemente gemacht werden. Neben den strukturell sensitiven Amidbanden des Proteinrückgrats sind im IR-Spektrum von Proteinen natürlich auch Schwingungen der Seitenketten zu beobachten. Da es im Reaktionszyklus von Retinalproteinen fast immer zu Protonenverschiebungen kommt, sind De- und Reprotonierungsreaktionen häufig. Diese finden in der Mehrzahl an den Seitenketten der Glutamin (Glu)- und Asparaginsäuren (Asp) statt. Man beobachtet daher prominente Differenzbanden im Bereich der C=O Streckschwingung und der asymmetrischen sowie symmetrischen  $\text{COO}^-$ -Valenzschwingung, sowie Banden durch COH-Biege- und CO-Streckschwingungen.

Zuordnung	Bandenposition in $\text{H}_2\text{O} / \text{cm}^{-1}$
Asp, $\nu\text{C}=\text{O}$	1716
Glu, $\nu\text{C}=\text{O}$	1712
Asp, $\nu_{as}\text{COO}^-$	1574 - 1579
Glu, $\nu_{as}\text{COO}^-$	1556 - 1560
Asp, $\nu_s\text{COO}^-$	1402
Glu, $\nu_s\text{COO}^-$	1404
Asp,Glu, $\delta\text{COH}$	1264 - 1450
Asp,Glu, $\nu\text{C}-\text{O}$	1160-1253

**Tabelle 2.4:** Asparagin- und Glutaminsäure-Seitenkettenschwingungen nach [49, 53].

## Messtechnik

Zur Aufnahme von Infrarotspektren kann man sich grundsätzlich zwei unterschiedlicher Techniken bedienen. Zum einen können dispersive Spektrometer, wie sie auch für die UV-vis Spektroskopie eingesetzt werden, verwendet werden, zum anderen Fourier-Transform-Spektrometer. Beide Methoden nutzen Plancksche Strahler als Strahlungsquellen. Beispiele hierfür sind der Nernst-Stift, ein Zirkoniumdioxid-Stab mit Zusätzen an Yttriumoxid beheizt auf 1600 °C, oder aber auch der Global, ein Siliziumcarbidstab, der elektrisch auf 980 bis 1650 °C erhitzt wird. Neuer sind mit Heizwendeln umwickelte Keramikstäbchen, welche von gesinterten Schichten aus Aluminiumoxid und Zirkonsilikat umgeben sind. Infrarotdetektoren wandeln die einfallende Strahlungsintensität in ein elektrisches Signal um. Man unterscheidet zwischen thermischen Detektoren und Quantendetektoren. Thermische Detektoren wie DTGS (Deuteriertes Triglycinsulfat) besitzen eine wellenlängenunabhängige Empfindlichkeit. Bei Quantendetektoren ist die Empfindlichkeit wellenzahlabhängig, sie sind jedoch sehr schnell und empfindlich. Ihr Arbeitsprinzip beruht auf dem photoelektrischen Effekt, bei dem Elektronen aus photoaktivem Material von Photozellen und Photomultipliern freigesetzt werden, die dann als Ladungsträger aufgefangen werden. Weit verbreitet ist der MCT-Detektor (engl.: Mercury Cadmium Tellurid), der eine sehr hohe Ansprechgeschwindigkeit und Empfindlichkeit hat, die sogar auf Schwankungen der Umgebungstemperatur reagiert. Dieser Detektor muss daher unbedingt stickstoffgekühlt betrieben werden.

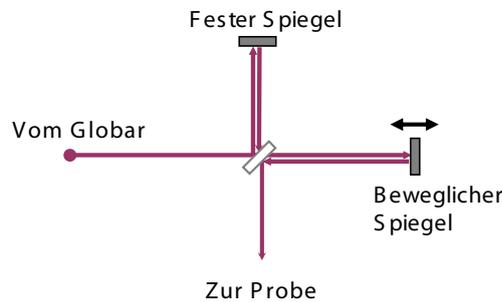
Ein klassisches Gitterspektrometer arbeitet nach dem Zweistrahlprinzip. Die Strahlung der Lichtquelle wird in zwei gleich intensive Teile aufgeteilt, von denen einer durch die Probe, der andere als Referenz durch das Lösungsmittel bzw. die Umgebungsluft geleitet wird. Durch einen Monochromator (Beugungsgitter oder Prisma) wird die Strahlung spektral divergiert, sodass der Detektor eine Wellenlänge nach der anderen aufzeichnen kann. Zeitaufgelöste Messungen können mit der dispersiven Technik in einer blitzlichtphotolyseanalogen Weise betrieben werden. Zum Abtasten werden hierbei meist Bleisalzdiodenlaser benutzt, die in bestimmten Wellenzahlenbereichen durchgestimmt werden können, jedoch aufgrund von Modensprüngen nicht auf allen Frequenzen stabil emittieren.

Das FTIR-Spektrometer arbeitet auf eine gänzlich andere Art und Weise. Die Grundidee dieser Technik ist es, alle Frequenzen des Spektrums simultan zu erfassen. Dies wird realisiert, indem die Strahlung mittels eines Interferometers (Michelson-Interferometer) in eine andere Domäne konvertiert wird. Analog zur herkömmlichen Fouriertransformation, in der Frequenzen ( $\frac{1}{s}$ ) in den Zeitraum ( $s$ ) übertragen werden, wird hier das Fourierpaar Wellenzahl ( $\frac{1}{cm}$ ) und Verschiebeweg ( $cm$ ) gebildet.

$$I(\delta) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} I(\tilde{\nu}) \exp(i\pi\tilde{\nu}\delta) d\tilde{\nu} \quad (2.13)$$

$$I(\tilde{\nu}) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \exp(i\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad (2.14)$$

Technisch wird dies folgendermaßen umgesetzt: Die IR-Strahlung wird durch einen Strahlteiler in zwei Teile aufgeteilt. Die eine Hälfte des Lichts wird auf einen fest angebrachten Spiegel reflektiert, die andere wird durchgelassen und gelangt so auf einen beweglichen Spiegel. Beide Strahlen werden nach Reflexion an diesen Spiegeln durch Rekombination zur Interferenz gebracht. Je nach Abstand des beweglichen Spiegels zur Interferometerplatte resultiert eine unterschiedliche Phasendifferenz zwischen den beiden Teilstrahlen, wodurch die Interferenzamplitude moduliert wird. Der Verlauf der Intensität am Detektor in Abhängigkeit von der optischen Wegdifferenz wird Interferogramm genannt. Die Intensität des Interferogramms ist an dem Punkt, an dem beide Spiegel den gleichen Abstand zum Strahlteiler haben, am größten, was unter dem Begriff ZPD (engl.: zero path difference) bekannt ist.



**Abbildung 2.2:** Schematischer Aufbau des Michelson-Interferometers im IR-Spektrometer.

Der vereinigte Messstrahl durchläuft nach dem Interferometer die Probe und trifft auf den Detektor. Am Detektor wird ein Interferogramm  $I(\delta)$  gemessen. Mit Hilfe eines Fast-Fourier-Transform-Algorithmus (FFT-Algorithmus) wird das Spektrum  $I(\tilde{\nu})$  der im Strahlengang befindlichen Probe berechnet. Um die Fourier-Transformation, die von  $-\infty < \delta < \infty$  definiert ist, für den endlichen Interferometerweg auszuführen, wird dem Integral die sogenannte Apodisationsfunktion  $D(\tilde{\nu})$  hinzugefügt, die innerhalb der beobachtbaren Intensitäten eins und außerhalb null ist.

$$I(\delta) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} I(\tilde{\nu}) D(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\delta \quad (2.15)$$

Um die Position des beweglichen Spiegels im Interferometer genau zu bestimmen, benutzt man einen Helium-Neon-Laser. Die Strahlung des Helium-Neon-Lasers verhält sich im Interferometer analog zur IR-Strahlung, generiert jedoch als monochromatische Strahlung bei Modulation ein sinusartiges Interferogramm.

Gegenüber der dispersiven Methodik hat das FTIR-Spektrometer folgende Vorteile:

- Reduzierte Aufnahmezeit, da alle Wellenlängen gleichzeitig aufgenommen werden. (Multiplex- oder Fellgett-Vorteil)
- Verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, da ständig die gesamte Leistung der Lichtquelle zur Verfügung steht. (Jacquinot-Vorteil)

- Präzise Wellenzahlenkalibrierung durch Verwendung eines Helium-Neon-Lasers. (Connes-Vorteil)

Die FT-Technik kann auch zur zeitaufgelösten Messung von Infrarotspektren genutzt werden. Man unterscheidet zwei Methoden: *RapidScan* und *StepScan*. Die RapidScan-Methode beruht dabei auf der schnellen, sukzessiven Aufnahme von vollständigen Interferogrammen. Der bewegliche Spiegel wird hierfür mit konstanter Geschwindigkeit zwischen zwei gewählten Positionen verfahren. Die Zeitauflösung dieser Technik ist daher durch die Spiegelgeschwindigkeit und die Anzahl an Mittlungen limitiert und liegt für herkömmliche Spektrometer bei etwa 10 ms.

Eine weitaus bessere Zeitauflösung von einigen Nanosekunden kann über die StepScan-Technik erreicht werden. Hierbei werden die einzelnen Spiegelpositionen nacheinander angefahren und der Zeitverlauf der Intensitäten des jeweiligen Interferometerpunktes nach Starten der Reaktion (meist in Form eines kurzen Laserblitzes) über eine schnelle Transientenrekorderkarte aufgenommen. Hierbei ist aber zu beachten, dass die Reaktion für jede anzufahrende Spiegelposition neu gestartet werden muss, wobei die Messbedingungen (Konzentration der Probe, Temperatur) identisch sein müssen. Nach Anfahren aller Verfahrenspunkte werden die zeitabhängigen Interferogramme gebildet und analog zu den statischen Spektren durch Fourier-Transformation umgerechnet.



# 3 Ultrakurzzeitspektroskopie

*Zeit ist das, was man an der Uhr abliest.*

Albert Einstein

Vorgänge auf molekularer Ebene laufen in einem Zeitbereich von nur wenigen hundert Femtosekunden ab. Will man diese Vorgänge in Echtzeit untersuchen, so benötigt man eine Technik mit eben dieser Zeitauflösung. Die Anreg-Abtast-Spektroskopie wurde für diese Fragestellung entwickelt. Die Zeitauflösung ist hier durch die Dauer der verwendeten Lichtpulse gegeben. Lasersysteme mit Femtosekundenpulsen sind mittlerweile kommerziell erhältlich. Da diese Lasersysteme aber nur auf einer Wellenlänge arbeiten, benötigt man zusätzlich Möglichkeiten zur Wellenlängenkonversion, die durch nichtlineare optische Methoden in doppelbrechenden Kristallen gegeben sind. Das Kapitel ist wie folgt strukturiert: Am Anfang wird ein Überblick über die theoretischen Hintergründe nichtlinearer Optik und Doppelbrechung in optischen Kristallen gegeben gefolgt von der Darstellung der Möglichkeiten zur Erzeugung kurzer Laserpulse. Da diese Prozesse in der Literatur gut beschrieben sind, sind die Inhalte nachfolgend zitierten Fachbüchern entnommen [54–61]. Das Kapitel schließt mit der Beschreibung der verwendeten Experimente.

## 3.1 Nichtlineare Optik

Fällt eine elektromagnetische Welle auf ein dielektrisches Medium, so erzeugt sie dort durch Ladungsverschiebung in den Molekülen induzierte elektrische Dipolmomente  $\vec{p}(E)$ , deren Vektor-Summe pro Volumeneinheit als dielektrische Polarisation  $\vec{P}$  bezeichnet wird. In der linearen Optik lässt sich die Abhängigkeit vom anliegenden Feld über folgende lineare Beziehung zwischen Polarisation  $\vec{P}$  und Feldstärke  $\vec{E}$  beschreiben.

$$\vec{P}_l(t) \approx \epsilon_0 \underline{\underline{\chi}}^{(1)} \vec{E}(t) \tag{3.1}$$

$\chi$  ist hierbei der Suszeptibilitätstensor. Gleichung 3.1 ist jedoch nur eine Näherung für kleine elektrische Feldstärken. Die bei kurzen Laserpulsen auftretenden hohen Strahlungsintensitäten führen dazu, dass die Beziehung zwischen Polarisation und Feldstärke nicht mehr linear ist, sondern nichtlinear. Bei der Beschreibung der Polarisation müssen jetzt auch Terme höherer Ordnung berücksichtigt werden. Die Größe der nichtlinearen Suszeptibilität hängt von der Art und der Symmetrie des nichtlinearen Mediums ab und ist ein Maß für die Größe der nichtlinearen Rückstellkraft bei der Verformung der Elektronenhülle durch die einfallende Lichtwelle.

$$\vec{P}_{nl}(t) = \epsilon_0 \left[ \underline{\chi}^{(1)} \vec{E}(t) + \left( \underline{\chi}^{(2)} \vec{E} \right) \vec{E}(t) + \left( \left( \underline{\chi}^{(3)} \vec{E}(t) \right) \vec{E}(t) \right) \vec{E}(t) \right] \quad (3.2)$$

Während die lineare Optik die Konsequenz hat, dass sich mehrere elektromagnetische Wellen, die gleichzeitig durch ein Medium propagieren, nicht gegenseitig beeinflussen (Superpositionsprinzip), führen die Beiträge höherer Ordnung in der nichtlinearen Optik dazu, dass durch die Wechselwirkung mehrerer Lichtbündel im Festkörper neue Frequenzen entstehen können.

Wichtige Effekte nichtlinearer Beiträge sind im Fall quadratischer Suszeptibilität  $\chi^2 \neq 0$  die Frequenzverdopplung, Summen- und Differenzfrequenzerzeugung sowie die parametrische Verstärkung. Die Suszeptibilität zweiter Ordnung weist im Festkörper ungefähr einen Wert im Bereich von  $\chi^{(2)} \approx 10^{-10} \frac{cm}{V}$  auf. Alle Prozesse entsprechen Drei-Wellen-Wechselwirkungen. Betrachtet man sich das ganze anschaulich, so wird im Photonenbild bei der Frequenzverdopplung aus zwei einlaufenden Photonen ein Photon doppelter Energie hergestellt. Bei der parametrischen Konversion wird hingegen ein einlaufendes Photon in zwei resultierende aufgespalten. Für die erwähnten Prozesse muss Energie- sowie Impulserhaltung gelten:

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_2 + \hbar\omega_1 + \Delta E; \quad \hbar\vec{k}_3 = \hbar\vec{k}_2 + \hbar\vec{k}_1 + \Delta\vec{k} \quad (3.3)$$

$\Delta\vec{k}$  hat prinzipiell bei effizienter Konversion keinen signifikanten Beitrag.

Die nichtlinearen Effekte um die Frequenzverdopplung sowie Summen- und Differenzfrequenzerzeugung können durch einfache mathematische Überlegung unter Vernachlässigung der vektoriellen Eigenschaften veranschaulicht werden. Hierfür betrachtet man die Wechselwirkung zweier oszillierender Felder  $E_1$  und  $E_2$ . Unter der Annahme, dass nur der erste nichtlineare Term aus Gleichung 3.2 eingeht, erhält man:

$$\begin{aligned} P_{nl}(t) &= \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ E_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + E_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] \\ &= \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[ E_1^2 \cos^2(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \right. \\ &\quad + E_2^2 \cos^2(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \\ &\quad \left. + 2 E_1 E_2 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] \end{aligned} \quad (3.4)$$

Nach Umformung erhält man neben der optischen Gleichrichtung ( $\omega = 0$ ) vier neue Frequenzanteile entstehen.

$$\begin{aligned}
 P_{2\omega_1} &= \epsilon_0 \chi^{(2)} E_1^2 \cos \left[ 2(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \right] \\
 P_{2\omega_2} &= \epsilon_0 \chi^{(2)} E_2^2 \cos \left[ 2(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] \\
 P_{\omega_1 + \omega_2} &= 2\epsilon_0 \chi^{(2)} E_1^2 E_2^2 \cos \left[ (\omega_1 + \omega_2)t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2) \vec{z} \right] \\
 P_{\omega_1 - \omega_2} &= 2\epsilon_0 \chi^{(2)} E_1^2 E_2^2 \cos \left[ (\omega_1 - \omega_2)t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2) \vec{z} \right]
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

Hierbei entsprechen die Terme  $P_{2\omega_1}$  und  $P_{2\omega_2}$  der Verdopplung (SHG, engl. second harmonic generation) der Ausgangsfrequenzen. Die Mischterme  $P_{\omega_1 + \omega_2}$  und  $P_{\omega_1 - \omega_2}$  beschreiben die Summenfrequenz (SFG, engl. sum frequency generation) sowie die Differenzfrequenz (DFG, engl. difference frequency generation).

Auf die kubischen Suszeptibilitäten soll hier nicht weiter eingegangen werden. Sie könnten prinzipiell aber analog behandelt werden. Wichtige Beispiele nichtlinearer Prozesse, für die  $\chi^{(2)} = 0$ ,  $\chi^{(3)} \neq 0$  ist, sind Frequenzverdreifachung, Vier-Wellen-Mischen, Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation, induzierte Streuung (Rayleigh, Raman) sowie Zwei-Photonen-Absorption. Typische Werte von  $\chi^{(3)}$  liegen im Festkörper bei Werten um  $\approx 10^{-17} \frac{\text{cm}^2}{\text{V}^2}$ .

## 3.2 Phasenanpassung in nichtlinearen Kristallen

Effektive Wellenlängenkonversion nur dann möglich, wenn die Phasenfehlanpassung gleich null

$$\Delta \vec{k} = 0 \tag{3.6}$$

bzw. die Kohärenzlänge, d.h. die Länge, nach der ein Wellenpaar so außer Phase schwingt, dass es maximal destruktiv interferieren, unendlich ist.

$$l_c = \infty \tag{3.7}$$

Eine Möglichkeit dies zu erreichen besteht in der Phasenanpassung in doppelbrechenden Materialien. Ein weiteres Verfahren wäre die *“Quasi-Phasenanpassung”*. Hierbei lässt man Phasenfehlanpassung zu, kompensiert sie aber durch die Benutzung von Kristallen mit ortsabhängiger periodischer Nichtlinearität. Diese Kristalle setzen sich aus mit der Kohärenzlänge wechselnden Schichten aus normalem und *“invertierten”* Kristall zusammen. Der schichtweise Vorzeichenwechsel der nichtlinearen Suszeptibilität zweiter Ordnung führt eine entgegengesetzte Phase ein, die zu einer besseren Anpassung führt. Ein Beispiel eines solchen Kristalls ist der periodisch gepolte  $\text{LiNbO}_3$  (PPLN)-Kristall. Dieser wird unter anderem im benutzten Kurzpulslasersystem der Firma Clark-MXR benutzt.

Die für die Phasenanpassung benutzten doppelbrechenden Materialien sind in der Regel optisch ein- oder zweiachsige Kristalle. Prinzipiell wird ein Laserstrahl beim Auftreffen

auf einen solchen Kristall in zwei Strahlen aufgespalten. Der eine ist hierbei senkrecht zur Ebene, die vom Wellenvektor und der optischen Achse aufgespannt wird, polarisiert und wird als ordentlich (O) bezeichnet. Der Brechungsindex  $n_O(\omega)$  ist unabhängig vom Winkel zwischen Einfallrichtung und optischer Achse des Kristalls  $\theta$ . Der andere Strahl ist parallel zur beschriebenen Ebene polarisiert. Er wird außerordentlich (EO, engl. extraordinary) genannt. Der Brechungsindex ist hier abhängig vom Winkel  $\theta$  und lässt sich wie folgt angeben.

$$\frac{1}{n_{EO}^2(\omega, \theta)} = \frac{\cos^2(\theta)}{n_O^2(\omega)} + \frac{\sin^2(\theta)}{n_{EO}^2(\omega)} \quad (3.8)$$

$n_{EO}^2(\omega)$  ist hier der außerordentliche Brechungsindex bei Einfall senkrecht zur optischen Achse.

Durch die Beobachtung zweier Brechungsindizes lassen sich jetzt zwei Fälle unterscheiden.

- $n_{EO}(\omega) > n_O(\omega) \Rightarrow$  Positiv einachsige Kristalle, z.B. Quarz
- $n_{EO}(\omega) < n_O(\omega) \Rightarrow$  Negativ einachsige Kristalle, z.B.  $\beta$ -Bariumborat (BBO)

Aufgrund der Tatsache, dass die Konversion in Kristallen mit normaler Dispersion vonstatten geht, muss die Oberwelle stets dem kleineren Brechungsindex zugeordnet werden. Das bedeutet, dass die Oberwelle in einem negativ uniaxialen Kristall als außerordentlich, in einem positiv uniaxialen Kristall als ordentlicher Strahl gewählt wird. In einer *Typ-I-Phasen Anpassung* ist daher die Polarisation der Grundwelle senkrecht zur Oberwelle. In einer *Typ-II-Phasen Anpassung* wird die Polarisation der Grundwelle auf den ordentlichen und den außerordentlichen Strahl verteilt, d.h. in einem  $45^\circ$ -Winkel zu den Kristallachsen eingestrahlt.

Die Winkelphasenanpassung beruht nun auf der Abhängigkeit des außerordentlichen Brechungsindex vom Winkel zwischen dem Wellenvektor und der optischen Achse,  $\theta$ . Für optisch einachsige Kristalle gilt:

$$n_{eo}(\theta) = \left( \frac{\cos^2(\theta)}{n_O^2} + \frac{\sin^2(\theta)}{n_{EO}^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (3.9)$$

Durch geeignete Wahl des Winkels zwischen Grundwelle und optischer Achse kann somit Phasen Anpassung erreicht werden. Für die Typ-I-Phasen Anpassung in einem negativ uniaxialen Kristall kann z.B. der Phasen Anpassungswinkel  $\theta_m$  für den Frequenzverdopplungsprozess über nachfolgende Gleichung berechnet werden.

$$\sin^2 \theta_m = \frac{n_O^{-2}(\omega) - n_O^{-2}(2\omega)}{n_{EO}^{-2}(2\omega) - n_O^{-2}(2\omega)} \quad (3.10)$$

Beschränkungen in der Anwendung nichtlinearer Kristalle ergeben sich durch mehrere auftretende Effekte. Zum einen kann die erzeugte Welle nur auf einer bestimmten Länge im Kristall verstärkt werden, da sich die einlaufenden und auslaufenden Wellen

in unterschiedliche Richtungen ausbreiten. Dieser Effekt wird als *räumlicher Walk-Off* bezeichnet. Hieraus resultiert, dass eine Verlängerung des Kristalls nicht mehr zu einer Intensitätssteigerung führt. Eine weitere Einschränkung liegt darin, dass der einfallende Strahl nur eine endliche Apertur aufweist. Hierdurch ergibt sich der sogenannte *Akzeptanzwinkel*. Auch die Unterschiede der Gruppengeschwindigkeiten (GV, engl. group velocity) der ein- und auslaufenden Strahlen führt nach einer bestimmten Länge zu einem Verlust der Phasenanpassung. Dieser Effekt wird in der einschlägigen Literatur als *zeitlicher Walk-Off* beschrieben.

Fasst man alle diskutierten Punkte zusammen so ergeben sich zur optimalen Frequenzkonversion folgende Anforderungen an nichtlineare Kristalle: Die Kristalle sollten von guter optischer Qualität sein, was gleichbedeutend mit einer hohen Zerstörschwelle ist, einen hohen nichtlinearen Koeffizienten aufweisen und im Wellenlängenbereich der beteiligten Strahlen transparent sein. Durch geeignete Schnittwinkel, muss die Phasenanpassungsbedingung erfüllt sein. Zudem muss noch auf kleine Walk-Off-Winkel sowie geringe Gruppengeschwindigkeitsdispersion geachtet werden.

### 3.3 Erzeugung ultrakurzer Laserpulse

Kurze Laserpulse werden durch Überlagerung von stehenden Wellen unterschiedlicher Frequenz erzeugt. Die Wellen müssen hierfür exakt in Phase sein. Durch Superposition der einzelnen Moden erzeugt man ein Wellenpaket, das ausgekoppelt werden kann. Dabei muss beachtet werden, dass die ausgekoppelten Pulse umso kürzer sind, je mehr Moden gekoppelt werden. Die Kopplung der Lasermoden kann mit unterschiedlichen Verfahren erreicht werden. Die Pulse im Resonator können dabei entweder über ein aktives oder ein passives Element hervorgerufen werden, was der jeweiligen Technik den Namen gibt.

#### *Aktive Modenkopplung*

Bei der aktiven Modenkopplung werden die oszillierenden Lasermoden gezielt durch akusto-optische oder elektro-optische Modulatoren gesteuert. Die Intensität der monochromatischen Lichtwelle wird hierbei mit der Frequenz  $f$  moduliert. Das Frequenzspektrum der optischen Welle weist daher neben der sogenannten Trägerfrequenz  $\nu_0$  Seitenbänder mit den Frequenzen  $\nu_0 \pm f$  auf. Die Seitenbänder entsprechen genau dann den Resonatormoden, wenn die Modulationsfrequenz  $f$  gleich dem Modenabstand ist. In diesem Fall können die Seitenbänder an der Laseroszillation teilnehmen und werden zudem selbst moduliert, wodurch höhere Bänder entstehen. Die Moden sind nicht mehr unabhängig voneinander, da sie durch den Modulator miteinander gekoppelt sind. Technisch ist die maximale Modulationsfrequenz auf wenige Gigahertz begrenzt. Es können daher nur Laserpulse mit Pulsdauern von einigen Nanosekunden bis zu hundert Pikosekunden erzeugt werden.

### *Passive Modenkopplung*

Weitaus kürzere Pulse können über passive Modenkopplung erzeugt werden. Hierbei wird der aktive Modulator im Resonator z.B. durch einen passiven Absorber ausgetauscht. Die Energieniveaus des Absorbers sollten eine möglichst kurze Relaxationszeit haben. Da der Absorber alle Pulse abschwächt, muss die Verstärkung im Lasermedium hoch sein. Der Absorber muss ein nichtlineares Sättigungsverhalten aufweisen. Er wird also mit zunehmender Pulsintensität transparenter. Das bedeutet, dass ein zufällig auftretender, leicht intensiverer Puls, ein sogenannter Laserspike, geringste Absorption und damit größte Nettoverstärkung erfährt. Nachdem der Puls nach wenigen Resonatorumläufen sehr stark angewachsen ist, macht er den überwiegenden Anteil der gesamten Laseremission aus. Nach einem Einschwingstadium besteht die Laseremission aus einer regelmäßigen Folge von intensiven Pulsen. Als Absorber können sowohl Farbstoffe, deren Relaxationszeiten im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-12}$  s liegen, als auch Halbleiter benutzt werden. Man kann hierbei Pulsdauern von wenigen Pikosekunden erhalten. Um noch kürzere Laserpulse zu erhalten, werden heute Techniken wie die *nichtlineare Polarisationsdrehung* (Angewandt im Oszillator des Clark-Lasersystems) sowie die *Kerr-Linsen-Modenkopplung* (Angewandt im Spectra Physics Laser) benutzt. Der Prozess der nichtlinearen Polarisationsdrehung beruht darauf, dass beim Propagieren eines intensiven Pulses durch eine optische Faser nichtlineare, intensitätsabhängige Änderungen im Polarisationszustand auftreten. Diese Änderung ist normalerweise nicht eine exakte Drehung der Polarisationsrichtung, sondern eher die Erzeugung eines elliptischen Polarisationszustands. Die physikalischen Gründe hierfür sind Selbstphasenmodulation, Kreuzphasenmodulation sowie Doppelbrechung in der Faser. Um den Kopplungsmechanismus in Gang zu setzen, bedarf es einer Fluktuation im Intensitätsprofil. Dieser Laserspike entsteht beispielsweise einfach aus dem Laseruntergrund, kann aber auch durch Bewegung eines Resonatorendspiegels generiert werden. Bei Erhöhung der nichtlinearen Wechselwirkungsstrecke im Resonator erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für das Selbststarten der Modenkopplung. Setzt man hinter die Faser eine Polarisationsoptik, beispielsweise einen Faraday-Rotator, der so angeordnet werden kann, dass die maximale Transmission bei der höchstmöglichen optischen Intensität stattfindet, erhält man einen künstlich hergestellten sättigbaren Absorber [62–66].

Bei der *Kerr-Linsen-Modenkopplung* wird der nichtlineare Prozess der Ausbildung einer Kerrlinse beim Durchtritt eines intensiven Laserstrahls durch ein nichtlineares Medium, z.B. Titan-Saphir, zur Modenkopplung benutzt [67–69]. Dieser Selbstfokussierungsprozess beruht auf der Nichtlinearität des Brechungsindex  $n$  in solchen Medien.

$$n(I) = n_0(\omega) + n_2(\omega) \cdot I \quad (3.11)$$

Da der Brechungsindex intensitätsabhängig ist, führt dies für ein gaußförmiges Intensitätsprofil im Laserstrahl zu unterschiedlicher Brechung. Je nachdem, ob  $n_2 > 0$  oder  $n_2 < 0$  ist, wirkt das nichtlineare Material als Zerstreuungs- oder Sammellinse. Im Falle von Titan-Saphir werden hohe Intensitäten stärker fokussiert als kleine Intensitäten, was zu einer Brechung der Randstrahlen in Richtung der Strahlachse und damit zur Fokussierung führt. Stellt man eine kreisförmige Blende in die Fokalebene beim Pulsmaximum, so werden

die hohen Intensitäten durchgelassen, die kleinen aber ausgeblendet. Dadurch werden die Pulsflanken abgeschnitten und der Puls verkürzt. Über Kerr-Linsen-Modenkopplung können Pulse von 10 bis 100 fs erzeugt werden.

#### Verwendete Lasersysteme

Eine Schwierigkeit der Kurzzeitspektroskopie besteht darin, dass die von den Laseroszillatoren bereitgestellten Pulsenergien für die Spektroskopie zu gering sind. Mitte der 1980er Jahre wurde diese Problematik durch die Entwicklung des Prinzips der “Chirped Pulse Amplification”, kurz CPA, eine bis heute weit verbreitete Methode zur Verstärkung, gelöst. Hierbei werden die Lichtpulse aus dem Oszillator von anfänglichen zehn bis hundert Femtosekunden auf eine Länge von einigen hundert Pikosekunden gedehnt, bevor die Verstärkung um einen Faktor  $10^5$ - $10^6$  erfolgt. Anschließend werden die Pulse wieder komprimiert. Ein komplettes Femtosekundenlasersystem benötigt demnach prinzipiell einen Oszillator, der die Femtosekundenpulse bereitstellt, und einen regenerativen Pulsverstärker mit vorgeschalteter Pulsdehnung und nachgeschalteter Komprimierung.

#### *Das Clark-CPA-2001 System*

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Anreg-Abtast-Experimente wurde ein Titan-Saphir-Festkörperlaser des Modells Clark MXR CPA 2001 benutzt, der grundsätzlich aus Diodenlaser, frequenzverdoppeltem Erbium-Glasfaseroszillator, Pulsstrecke, frequenzverdoppeltem Nd:YAG-Pumplaser, regenerativem Titan-Saphir-Verstärker sowie Kompressor aufgebaut ist [70]. Der Oszillator besteht aus einem Ringresonator in Glasfasertechnik mit einer Freistrahlstrecke für optische Elemente. Die Glasfaser ist teilweise mit  $\text{Er}^{3+}$ -Ionen dotiert, die das aktive Medium darstellen. Die undotierte Faser besitzt anomale Dispersion. Sie kann hierdurch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion der dotierten Faser sowie der anderen optischen Elemente kompensieren. Über eine Faser wird der cw-Strahl (980 nm) des Diodenlasers eingekoppelt. Dies führt zur Besetzungsinversion in der Erbium-Faser. Die richtige Einstellung der Wellenplättchen ermöglicht den Pulsbetrieb des Ringlasers über nichtlineare Polarisationsdrehung. Desweiteren dient ein doppelbrechender Filter als Bandpass. Um den Oszillator nur in eine Richtung zu betreiben, benötigt man zudem noch einen optischen Isolator. Die Pulse der Zentralwellenlänge von 1550 nm werden in einem Lithiumborat-Kristall auf 775 nm frequenzverdoppelt.

Die Energie der Pulse aus dem Oszillator ist für die nichtlinearen Prozesse des Experiments nicht ausreichend. Die Pulse werden daher im regenerativen Verstärker nachverstärkt. Als Verstärkermedium dient ein Titan-Saphir-Kristall. In diesem sind ca. 0,1 Gew. %  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen durch  $\text{Ti}^{3+}$ -Ionen ersetzt und in die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Matrix eingebaut. Die Sauerstoffionen sind hexagonal dichtest gepackt. Die  $\text{Al}^{3+}$ - bzw.  $\text{Ti}^{3+}$ -Ionen liegen in den Oktaederlücken. Da  $\text{Ti}^{3+}$ -Ionen einen ca. 25 % größeren Ionenradius als  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen besitzen, kommt es zu einer trigonalen Verzerrung der Kristallstruktur. Dies führt dazu, dass der normalerweise dreifach entartete Grundzustand  ${}^2T_{2g}$  und der energetisch höher liegende, zweifach entartete  ${}^2E_g$ -Zustand weiter aufgespalten werden. Zudem wird durch

starke Kopplung der Zustände an die Schwingungsmoden des Saphir-Kristalls homogene Verbreiterung hervorgerufen. So kommt es, dass sowohl die Fluoreszenzbande bei ca. 800 nm als auch die Absorptionsbande bei ca. 500 nm einige 100 nm breit ist [71]. Da aufgrund der Heisenbergschen Unschärferelation ein Lichtimpuls umso kürzer sein kann, je breiter das Frequenzspektrum ist, aus dem dieser zusammengesetzt ist, ist Ti:Saphir ein geeignetes Medium sowohl für die Erzeugung als auch für die Verstärkung von Femtosekundenpulsen. Zur Verstärkung wird der Ti:Saphir-Kristall über einen Nd:YAG-Laser gepumpt. Die Pockelszelle und der Strahlteiler, die die Seedpulse aus dem Oszillator in den Resonator einkoppeln, dienen als optischer Schalter. Durch ein Triggersignal des Pumpasers wird die Pockelszelle bei Besetzungsinversion aktiviert. Der zweite Strahlteiler steht nun für die Pulse mit veränderter Polarisation auf Durchlass und kopplet die Pulse in den Verstärker ein. Nach sieben Umläufen wird der Puls mit einer etwa sechs Größenordnungen höheren Energie ausgekoppelt.

Um Beschädigungen von Optiken durch zu hohe Spitzenintensitäten zu vermeiden, werden die aus dem Oszillator kommenden Pulse in einem Pulsstreckter von ca. 100 fs auf etwa 200 ps gedehnt. Nach ihrer Verstärkung in der regenerativen Verstärkereinheit werden die Pulse abschließend wieder komprimiert. Hierzu verwendet man einen Gitterkompressor [72, 73]. Bei stabilem Betrieb erhält man Pulsdauern von 150 fs bei einer festen Wellenlänge von 775 nm und einer Repetitionsrate von 1 kHz. Die Pulsenergie beträgt ungefähr  $800 \mu\text{J}$ .

#### *Das Spectra-Physics Tsunami-Spitfire-System*

Die in dieser Arbeit getätigten Fluoreszenzaufkonvertierungsmessungen benutzen ein Spectra Physics Tsunami-Spitfire-Lasersystem als Pulsquelle [74]. In diesem werden die kurzen Laserpulse über Kerr-Linsen-Modenkopplung in einem Ti:Sa-Oszillator hergestellt, der über einen frequenzverdoppelten Nd:YVO<sub>4</sub> Lasers (cw, 532 nm) gepumpt wird. Man erhält hierdurch Pulse im 100 fs Bereich mit einer Repetitionsfrequenz von 80 MHz und einer Pulsenergie von etwa 7 nJ. Über den Einbau eines Spalts im internen Prismenkompressor ist es möglich den Laser innerhalb eines Wellenlängenbereichs von 760 nm und 840 nm durchzustimmen. Nach dem Prinzip der CPA werden die den Oszillator verlassenden Pulse in der Spitfire-Verstärkereinheit verlängert und verstärkt. Die Verstärkung findet in einem Ti:Sa-Kristall statt, bei dem die Energie der umlaufenden Pulse über einen gütegeschalteten Nd:YLF-Laser auf 1,2 mJ erhöht wird. Hiernach werden die Pulse in einem Pulskompressor zeitlich komprimiert. Die Ein- und Auskopplung des Resonators wird über Pockelszellen gewährleistet. Man erhält Pulse im Bereich von 100 fs mit einer Energie von 1,2 mJ bei einer Repetitionsrate von 1 kHz.

## 3.4 Anreg-Abtast-Spektroskopie

Die Untersuchung ultraschneller Phänomene auf einer Zeitskala von Attosekunden bis hin zu wenigen Nanosekunden beruht auf dem Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie. Hierbei wird die Probe durch den sogenannten Anreg- bzw. Pumpuls in einen z.B.

elektronisch oder vibratorisch angeregten Zustand versetzt. Nach einer über eine optische Verzögerungsstrecke definierten Zeit fragt ein weiterer Puls, der Abtast- bzw. Probepuls, die Reaktion ab, indem die Änderung der Transmission oder Reflexion gemessen wird.

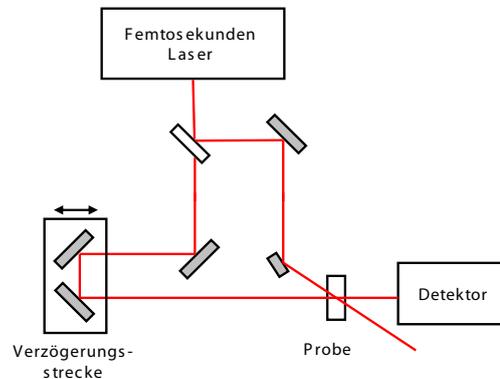


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Anreg-Abtast-Experiments.

Die Beobachtung des Abtastpulssignals als Funktion der Verzögerungszeit gibt die Dynamik nach Photoanregung wieder. Das Abtastsignal wird normalerweise über mehrere tausend Pulse gemittelt. Die Zeitauflösung des Experiments hängt hierbei lediglich von der Länge der Pulse ab. Man benötigt daher ultrakurze Pulse in einem Bereich weniger Femtosekunden.

Um die Verzögerung der Pulse ohne zeitlichen Jitter zu bewerkstelligen ist es unabdingbar, dass sie den gleichen Ursprung haben. Es ist aber durchaus üblich, dass beide unterschiedliche Wellenlängen besitzen, was man als Zwei-Farben- Anreg-Abtast-Spektroskopie bezeichnet. Diese Wellenlängenkonversion wird über die in Kapitel 3.1 theoretisch beschriebenen nichtlinearen Prozesse bewerkstelligt.

### 3.4.1 Transiente Absorption im sichtbaren Spektralbereich

Prinzipiell können Anreg-Abtast-Experimente in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden in der Mehrzahl transiente Absorptionsänderungen mit Anreg- und Abtastpuls im UV sowie sichtbaren Spektralbereich benutzt. Durch die Anregung in diesem Spektralbereich werden Änderungen der elektronischen Struktur induziert und eine Population im elektronisch angeregten Zustand generiert. Durch Abtastung mit einem spektral breiten Weißlichtpuls können die Dynamik dieser Zustände und ihre Reaktionskanäle aufgeklärt werden. Verschiebungen von Banden geben zudem Rückschlüsse auf Energieumverteilungen sowie Kühlprozesse.

Die folgenden Abschnitte erläutern zuerst die Physik der benutzten Konversionsprozesse. Hierbei wird zuerst auf die Weißlichterzeugung als Mittel zur Generierung spektral breiter Abtastimpulse eingegangen. Danach werden mehrere Möglichkeiten aufgezeigt, die Anregungspulse im nahen UV sowie im sichtbaren Spektralbereich durchzustim-

men. Anschließend wird ein Überblick über den verwendeten Aufbau gegeben und die wichtigsten Komponenten werden dargelegt.

#### *Weißlichterzeugung*

In der vorliegenden Arbeit wurden stabile und spektral breite Weißlichtpulse durch Fokussierung in ein transparentes Medium generiert [75]. Der kurze Laserpuls wird hier beim Durchgang durch den Festkörper spektral verbreitert. Medien der Wahl sind Saphir sowie  $\text{CaF}_2$ , wobei letzteres deutlich intensivere Anteile im UV-Bereich  $\leq 430$  nm aufweist. Der vollständige Mechanismus der Weißlichterzeugung ist bis dato nicht endgültig geklärt [76–79]. Fest steht jedoch, dass Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation mitverantwortlich für die Verbreiterung des Spektrums sind [80]. Selbstfokussierung, auch transversaler Kerr-Effekt genannt, ist ein nichtlinearer Effekt dritter Ordnung, der wie folgt veranschaulicht werden kann: Aufgrund des nichtlinearen, intensitätsabhängigen Brechungsindex erfährt ein Laserbündel gaußförmiger Intensitätsverteilung in der Mitte den größten Brechungsindex. Dies bewirkt, dass die Intensität zum Zentrum des Strahls hin gebündelt wird. Der Vorgang ist identisch zu einem Durchtritt durch eine konvexe Linse, nur dass die Kerr-Linse vom Puls selbst erzeugt worden ist. Der Prozess der Selbstphasenmodulation kann in folgendem Bild beschrieben werden: Wenn ein Lichtpuls durch ein nichtlineares Medium propagiert, dann ändert sich der Brechungsindex an einer Stelle  $x$  mit der Zeit. Dies führt dazu, dass die Phasen der intensiven zentralen Spektralkomponente gegenüber den äußeren Phasen verschoben werden. Diese Phasenverschiebung ist gleichbedeutend mit einer Frequenzverschiebung des Laserlichtes. Im Falle der ansteigenden Flanke des Pulses erhält man eine Verschiebung in Richtung zu roten Wellenlängen, im Falle der abfallenden Flanke zu blauen Wellenlängen. Der Puls wird also spektral verbreitert. Effekte wie das Vier-Wellen-Mischen, die stimulierte Raman- und Brillouinstreuung oder die Bandlücke des verwendeten Materials bestimmen dabei die spektralen Eigenschaften des Weißlichtkontinuums [81, 82].

#### *Frequenzverdopplung*

Die Frequenzverdopplung, kurz SHG (engl.: Second Harmonic Generation), ist ein Sonderfall der bereits in Kapitel 3.1 theoretisch beschriebenen Summenfrequenzerzeugung. Bei der Summenfrequenzerzeugung wird im Photonenbild aus zwei einlaufenden Photonen ein auslaufendes Photon erzeugt. Im Fall der Frequenzverdopplung haben die zwei einlaufenden Photonen die gleiche Frequenz. Auch hier muss wieder Energie- und Impulserhaltung gelten. Anschaulich bedeutet Frequenzverdopplung also, dass ein Laserstrahl der Frequenz  $\omega$  in einem nichtlinearen Kristall, im vorliegenden Fall  $\beta$ -Bariumborat ( $\beta$ -BBO), in einen Strahl der Summenfrequenz  $2\omega$  umgewandelt wird [83].  $\beta$ -BBO ist ein negativ einachsig doppelbrechender Kristall. Aufgrund seines großen Transparenzbereichs von 190 nm bis  $3 \mu\text{m}$ , seiner hohen Zerstörschwelle und seiner effektiven Nichtlinearität gehört  $\beta$ -BBO zu den am weitesten verbreiteten nichtlinearen Kristallen. Er wird auch für die meisten der nachfolgenden nichtlinearen Konversionsprozesse benutzt.

### *Der nichtkollineare optisch parametrische Verstärker*

Die Wellenlängenkonversion im nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärker, kurz NOPA (engl.: noncollinear optical parametric amplifier), ist ein nichtlinearer Prozess zweiter Ordnung. Sie basiert auf dem Prinzip des Drei-Wellen-Mischens. Hierbei wird bei Fokussierung in einen nichtlinearen Kristall ein Pumplichtpuls in eine Signalwelle und eine niederfrequente Idlerwelle aufgespalten. Durch Einstrahlung von Seed-Weißlicht kann je nach zeitlichem Zusammentreffen eine bestimmte Wellenlänge verstärkt werden. Für die drei Wellen muss Energieerhaltung und Impulserhaltung gelten. Die nachfolgende Gleichung beschreibt die Energieerhaltung, wobei das Teilungsverhältnis der Energien für die zwei entstehenden Photonen durch Wahl der experimentellen Randbedingungen einstellbar ist.

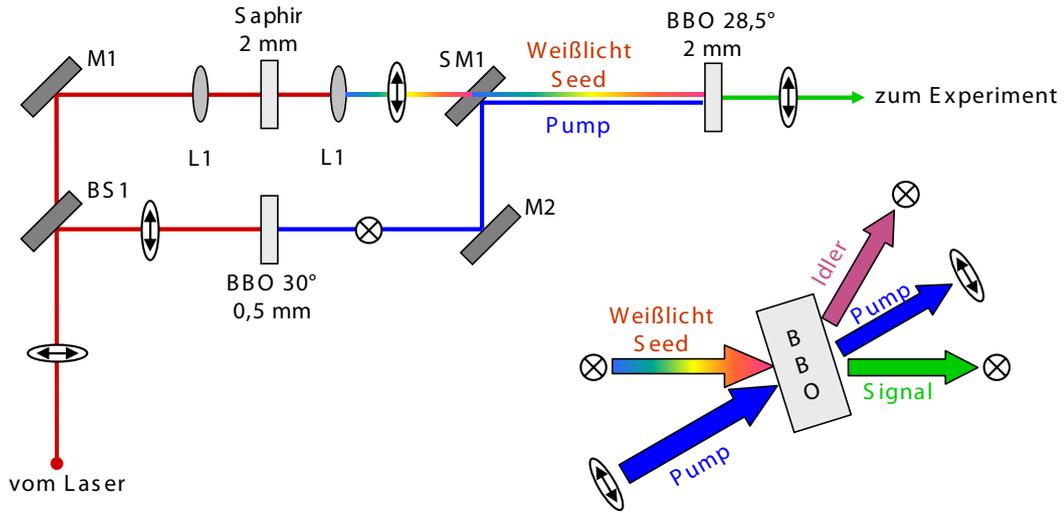
$$\omega_{Idler} = \omega_{Pump} - \omega_{signal} \quad (3.12)$$

Die Impulserhaltung entspricht im Photonenbild der Phasenanpassung. Phasenanpassung kann anschaulich als gleich schnelle Propagation der Wellenfronten, in diesem Fall von Signalwelle und Pumpwelle, gesehen werden. Bei Nichtübereinstimmung der Phasengeschwindigkeiten kommt es zu destruktiver Interferenz und damit zu einer Abnahme der Konversionseffizienz.

Die Bedingung für die Phasenanpassung lautet:

$$\Delta\vec{k} = \vec{k}_{Pump} - \vec{k}_{Signal} - \vec{k}_{Idler} = 0 \quad (3.13)$$

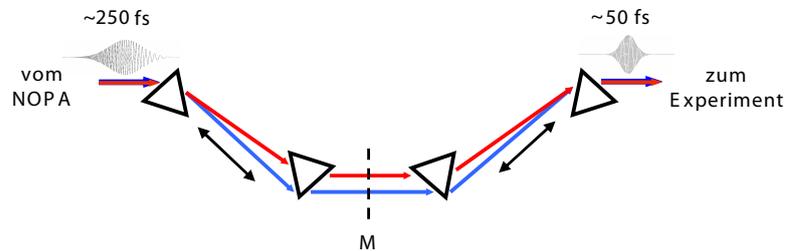
Im NOPA ist die Geometrie der Wellenvektoren nichtkollinear, was bedeutet, dass die Wellenvektoren  $\vec{k}_{Pump}$ ,  $\vec{k}_{Signal}$  und  $\vec{k}_{Idler}$  nicht parallel zueinander sind. Das heißt wiederum, dass die Phasenanpassung für viele verschiedene Wellenlängen erreicht werden kann. Durch die nichtkollineare Anordnung ist es zudem möglich, die Gruppengeschwindigkeit zwischen Idlerwelle und Signalwelle anzupassen. Hierdurch lässt sich sowohl der Verstärkungsfaktor als auch die Verstärkungsbandbreite erhöhen. Die zeitliche Ausdehnung der Pulse wird unterdrückt. Zur Realisierung der oben angesprochenen Vorgänge wurde  $\beta$ -BBO als doppelbrechendes Medium verwendet. Abbildung 3.2 zeigt den schematischen Aufbau des in dieser Arbeit benutzten NOPAs. Über einen Strahlteiler wurde der ankommende Strahl aus dem Laser für die Konversion in den Pump- und den Seedstrahl aufgeteilt. Der Pumpstrahl wird zuerst in einem  $\beta$ -BBO-Kristall ( $\theta = 30^\circ$ ,  $d = 0,5$  mm) frequenzverdoppelt, bevor er über einen Hohlspiegel in den NOPA-Kristall fokussiert wird ( $\theta = 29^\circ$ ,  $d = 2$  mm). Aufgrund des Zerfalls der Pumpphotonen in je zwei Photonen (Signal und Idler) bildet sich ein parametrischer Superfluoreszenzring. Fokussiert man nun den in 2 mm dickem Saphir erzeugten Weißlichtstrahl unter einem geeigneten Winkel zum Pumpstrahl in den NOPA-Kristall, findet die Verstärkung statt. Durch die zeitliche Verzögerung des Weißlichtstrahls kann man die gewünschte Farbe mit dem Pumpstrahl überlappen. Man erhält so Pumpphotonen in einem Wellenlängenbereich von 470 nm bis 1600 nm [84–86]. Die nichtkollineare Geometrie sowie die Polarisation der Strahlen ist in Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abbildung 3.2:** Schematischer Aufbau des nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkers (NOPA). Die Polarisationen sind sinnbildlich dargestellt. M1 = Hochreflektierender Spiegel für 775 nm, M2 = Hochreflektierender Spiegel für 389 nm, BS = Strahlteiler, SM = Hohlspiegel, L1 = Konvexlinse

### Der Prismenkompressor

Da der durch nichtlineare Optik konvertierte Puls bereits mehrere optische Materialien durchlaufen hat, ist er aufgrund der durch diese Materialien hervorgerufenen positiven Gruppengeschwindigkeitsdispersion verbreitert. Da Experimente mit möglichst kurzen Laserpulsen durchgeführt werden sollen, muss dem Puls anschließend eine negative Gruppengeschwindigkeitsdispersion zugefügt werden, damit er wieder komprimiert wird [75, 87, 88]. Dies ist prinzipiell mit Gittern, Prismen oder gechirpten Spiegeln möglich, da diese die unterschiedlichen Wellenlängen in unterschiedliche Richtungen brechen (Wellenlängenabhängigkeit der Winkeldispersion) und die Wellenlängenkomponenten damit wieder überlagert werden können. Abbildung 3.3 zeigt die schematische Darstellung des Prismenkompressors. Prinzipiell müssen vier Prismen durchlaufen werden, da die Wellenlängen nach dem Durchgang durch zwei Prismen zwar parallel sind, nicht aber

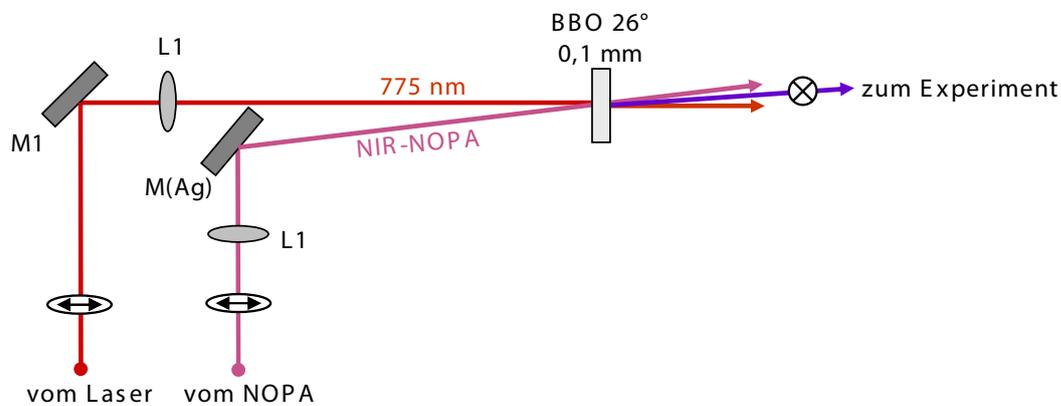


**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung des Kompressoraufbaus mit vier Prismen. M = Spiegelposition für einen Zweiprismenaufbau.

aufeinander liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies dadurch realisiert, dass zwei Prismen zweifach in entgegengesetzter Richtung durchlaufen werden. Der Betrag der negativen Gruppengeschwindigkeitsdispersion und damit die Kompression der Pulse werden durch Variation der durchlaufenen Glasstrecke sowie dem Abstand der Prismen innerhalb der Paare (angedeutet durch einen Doppelpfeil) bestimmt.

### Die Summenfrequenzerzeugung

Um spektral durchstimmbare Anregpulse im UV-Bereich zu erhalten wurden in früheren Jahren starke n-IR-Pulse frequenzverdoppelt, vervierfacht oder aufwärtskonvertiert [89]. Hierbei wurde jedoch nur ein Bereich von 250-350 nm abgedeckt und die erhaltenen Energien waren zudem gering. Alternativ konnten durch einen mit 258 nm gepumpten NOPA Pulse im Bereich von 335-480 nm erzeugt werden [90]. Der in dieser Arbeit



**Abbildung 3.4:** Schematischer Aufbau der Summenfrequenzerzeugung. Die Polarisationen sind symbolisch dargestellt. M1 = Hochreflektierender Spiegel für 775 nm, M(Ag) = Silberspiegel, L1 = Konvexlinse

verwendete Ansatz von Kozma et al. [91] benutzt das Prinzip der Summenfrequenzbildung des NOPAs mit der Lasergrundwellenlänge. Hierdurch können durch die hohe Durchstimbarkeit des NOPAs UV-Pulse im Bereich von 290-450 nm generiert werden, die sehr hohe Pulsenergien und gute Stabilität aufweisen.

Eine schematische Darstellung des optischen Aufbaus ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Zur Frequenzkonversion wurde ein 0,1 mm dicker  $\beta$ -BBO-Kristall mit einem Schnittwinkel von  $\theta = 45^\circ$  benutzt. Die benutzte Anordnung lieferte Pulsbreiten von  $\approx 130$  fs. Auf eine weitere Kompression mit einem speziellen UV-Prismenkompressor [91] wurde verzichtet.

### Der Messplatz

Bei dem in dieser Arbeit benutzten experimentellen Aufbau wird der wellenlängenoptimierte und komprimierte Anregpuls über eine schrittmotorgesteuerte Umwegstrecke relativ zu den Abtastimpulsen verzögert und anschließend über einen Off-Axis-Parabolspiegel

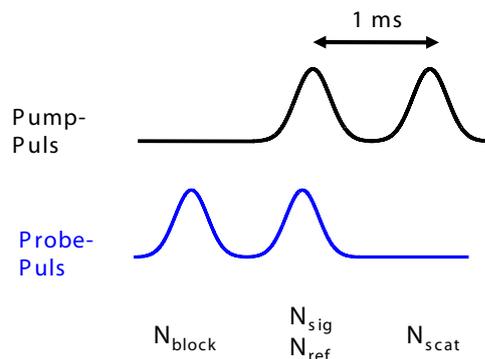


Abbildung 3.5: Durch Chopper erhaltene Pulsfolge.

in die Probe fokussiert. Die Probe wird in einer 0,1 bis 1 mm dicken Quarzküvette bereitgestellt. Die Konzentration der Probe ist so eingestellt, dass die optische Dichte bei der Anregungswellenlänge 0,5 bis 1 beträgt. Da die Photozyklen der Proben in Zeitbereichen bis zu Sekunden liegen, muss ein Austausch des Probenvolumens gewährleistet sein, damit im beobachteten Volumen nicht ein Gemisch aus verschiedenen Intermediaten der Photoreaktion entsteht. Hierzu wird die Probe lateral mit entsprechender Geschwindigkeit bewegt.

Das Abtastweißlicht wird mittels eines Strahlteilers in zwei Bündel aufgespalten. Ein Teil des Weißlichts wird über den schon für die Fokussierung des Anregpulses benutzten Off-Axis-Parabolspiegel in die Probe fokussiert und nach dem Durchgang durch die Probe im Signal-Spektrometer analysiert. Der andere Teil dient als Referenz und geht nach der Strahlteilung direkt in das Referenz-Spektrometer. In den Spektrometern werden die verschiedenen Anteile des Weißlichts spektral dispersiert und auf eine Diodenzeile mit 42 Elementen fokussiert. Diese wird im Einzelschussdetektionsmodus über einen A/D-Wandler mit dem PC ausgelesen. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern stehen sowohl im Anreg- als auch im Abtastarm des Experiments Chopper. Diese Schlitzscheiben dienen dazu, den Puls zu gewünschten Zeiten zu blocken. Die beiden Chopper sind so aufeinander abgestellt, dass sich das in Abbildung 3.5 dargestellte Pulsmuster ergibt. Das Pulsmuster ermöglicht es, das Streulicht und Fluktuationen in der Weißlichtaufspaltung zu bestimmen und vom Signal abzuziehen. Da Referenzarm und Signalarm nicht gleich intensiv sind, ist es nicht möglich das Absolutspektrum zu messen. Der Term

$$\frac{N(t, \lambda)_{block,ref}}{N(t, \lambda)_{block,sig}}$$

ermöglicht es aber das Relativspektrum zu erhalten. Die Absorptionsänderung der Probe ergibt sich nach folgender Formel:

$$\Delta A = \log \left( \frac{N(t, \lambda)_{block,ref} - N(t, \lambda)_{therm,ref}}{N(t, \lambda)_{block,sig} - N(t, \lambda)_{therm,sig}} \cdot \frac{N(t, \lambda)_{sig} - N(t, \lambda)_{therm,sig} - N(t, \lambda)_{scat,sig}}{N(t, \lambda)_{ref} - N(t, \lambda)_{therm,ref} - N(t, \lambda)_{scat,ref}} \right) \quad (3.14)$$

Die in der Formel verwendeten Abkürzungen stehen für ref = Referenz, sig = Signal, block = geblockt, therm = thermisches Rauschen, scat = Streulicht (engl: scattering).

### Artefakte um den Zeitnullpunkt

Ganz allgemein entstehen durch die nichtlineare Wechselwirkung der elektrischen Felder von Anreg- und Abtastimpuls kohärente Artefakte. Neben diesen Kohärenzen sind zudem noch weitere Effekte um den Zeitnullpunkt durch die Eigenschaften der Pulse zu erwarten. Im folgenden sollen diese kurz erläutert werden.

#### *Kohärente Effekte um den Zeitnullpunkt und deren Korrektur*

Die Wechselwirkung von Anreg- und Abtastpuls führt bei transienten Absorptionsmessungen zu kohärenten Effekten. Da die Dephasierungszeiten im Bereich von 10-30 fs liegen, sind diese Kohärenzen um den Zeitnullpunkt zu finden. Die wichtigsten zugrundeliegenden Effekte sind hierbei Zweiquantenabsorption, Kreuzphasenmodulation sowie die impulsive stimulierte Ramanstreuung [92–95]. Da diese Kohärenzen auch im Lösungsmittel auftreten, werden sie häufig als kohärentes Lösungsmittelsignal bezeichnet. Kovalenko et al. [95] konnten zeigen, dass sie im Probenspektrum durch Subtraktion des unter gleichen Bedingungen und gleicher Geometrie gemessenen Lösungsmittelsignals korrigiert werden können.

#### *Dispersion des Zeitnullpunkts durch gechirpte Abtastpulse*

Ein weiterer, nicht vernachlässigbarer Effekt ist die Wellenlängenabhängigkeit des Zeitnullpunkts. Dieser ist im Chirp des spektral breiten Abtastpulses begründet, der auf den Durchgang durch jedwedes dispersive Material wie Glas (Quarz und BK7), Lösungsmittel aber auch Luft zurückzuführen ist. Der Puls wird hierdurch zudem in die Länge gezogen. Eine Kompression der Pulse durch einen Prismenkompressor wurde nicht vorgenommen.

Zur Bestimmung des Zeitnullpunkts wird die Lösungsmittelmessung benutzt. Die Nullpunkte werden hierbei zuerst über die Lage der kohärenten Artefakte grob festgelegt und gegen die Wellenlänge aufgetragen. Diese Kurve wird durch die sogenannte Sellmeier-Gleichung beschrieben, eine empirisch ermittelte Beschreibung der Abhängigkeit des Brechungsindex  $n$  eines Mediums von der Wellenlänge  $\lambda$  [96].

$$n^2 = 1 + \sum_j \frac{A_j \lambda^2}{\lambda^2 - B_j} \quad (3.15)$$

$A_j$  und  $B_j$  sind materialabhängige Koeffizienten. Das Fitten dieser Funktion an die grob bestimmten Zeitnullpunkte berechnet die Verschiebung aus der Gruppengeschwindigkeitsdispersion beim Durchgang durch verschiedene optische Materialien. Um Fehler der ursprünglichen Abschätzung bei Abtastwellenlängen, an denen der Nullpunkt mit dem Auge nicht eindeutig erkannt werden kann, zu beheben, wurden die Ergebnisse der ersten Schätzung durch die optimal angepassten Werte des Modells ersetzt. Der Nullpunkt kann so auf 10 fs genau angegeben werden [95].

### Polarisation und Anisotropie

In der Anreg-Abtast-Spektroskopie hängt das Probensignal neben dynamischen Effekten, die über die Verzögerungszeit der Pulse wiedergegeben werden, noch von zwei weiteren Faktoren ab:

- Relative Polarisierung des Anreg- und Abtastpuls
- Winkel  $\theta_{ij}$  zwischen den Übergangsdipolmomenten, die auf den Anreg- und Abtastpuls reagieren

Bei Anregung der Probe mit einem polarisierten Puls werden bevorzugt die Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Polarisierung ist. Die Anregungswahrscheinlichkeit ist proportional zu  $(\vec{\mu} \cdot \vec{E})^2$  und damit auch proportional zu  $\cos^2 \theta$  (Photoselektion). Verändert sich ein beobachtetes Dipolmoment während der Observationszeitspanne, so kann diese Veränderung über polarisationsabhängige Messungen visualisiert werden. Ein Maß für die Orientierung der Übergangsmomente ist die Anisotropie  $r$ . Sie lässt sich aus den Messungen von Anreg- und Abtastpuls in paralleler ( $\parallel$ ) und senkrechter ( $\perp$ ) Geometrie berechnen [97, 98].

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3.16)$$

Für den Fall, dass nur ein elektronischer Zustand durch Anregung populiert wurde, kann die Anisotropie auch über folgenden Ausdruck wiedergegeben werden.

$$\begin{aligned} r &= \frac{1}{5}(3 \cos^2 \theta_{ij} - 1) \\ &= \frac{2}{5} \langle P_2(\cos(\theta_{ij})) \rangle \end{aligned} \quad (3.17)$$

$P_2$  ist hierbei das Legendre-Polynom zweiter Ordnung der Korrelation des Übergangsdipolmoments bei  $t=0$  mit dem bei der Zeit  $t$ . Die Anisotropie kann Werte von  $r = \frac{2}{5}$ ,

was einer parallelen Ausrichtung des beobachteten Dipols zum angeregten entspricht, bis zu  $r = -\frac{1}{5}$  für senkrechte Dipole annehmen.

Die Abhängigkeit des Signal von der Rotationsdiffusion der Moleküle, kann dadurch unterdrückt werden, dass im sogenannten magischen Winkel  $\theta_M = 54,74^\circ$  gemessen wird. Die Anisotropie ist in diesem Fall nicht vorhanden, da der Term

$$3 \cos^2 \theta_M - 1 = 0 \quad (3.18)$$

ist. Das Signal im magischen Winkel kann entweder direkt durch die Benutzung von Wellenplatten und Polarisatoren gemessen werden oder über die Messungen in paralleler und senkrechter Anreg-Abtast-Geometrie berechnet werden.

$$I(54,74^\circ) = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \quad (3.19)$$

Wie anhand von Reaktionszentren gezeigt wurde, sollte der Prozess der Rotationsdiffusion bei großen (Protein-)Systemen außer Acht gelassen werden können [99].

### Durchführung der Messung

Um die zeitliche und räumliche Überlagerung des Anreg- und Abtastpulses zu bestimmen wird ein die Anregungswellenlänge stark absorbierender, bekannter Farbstoff anstelle der Probe in den Strahlengang gestellt. Die Überlappung der beiden Lichtpulse wird mittels der starken induzierten Absorptionsänderung, beispielsweise der Absorption des angeregten Zustands, optimiert. Hierbei kann auch eine Anpassung des Fokus hilfreich sein. Man geht davon aus, dass der Anstieg am Zeitnullpunkt durch eine mit der Kreuzkorrelationszeit ausgeschmierte Errorfunktion beschrieben werden kann. Der Wendepunkt dieser Funktion beschreibt den Zeitnullpunkt. Nach dieser Vorjustage wird die zu untersuchende Probe unter gleicher Geometrie in den Strahlengang eingebaut. Je nach Signalintensität kann versucht werden den Überlapp auf die eigentliche Probe zu optimieren. Der Probenmessung folgt eine Messung des Lösungsmittels. Hierdurch können wie oben beschrieben die Dispersion des Nullpunkts sowie das kohärente Artefakt um  $t_0$  korrigiert werden.

### Auswertung der Daten

Die erhaltenen Messdaten wurden mit einer auf IDL 6.0 basierenden Software z20 ausgewertet. Die Software enthält fünf Programmkomponenten, von denen in dieser Arbeit drei, nämlich *IKMITTEL*, *NKVIEW* und *MULTIVIEW* nacheinander zur Auswertung der Daten durchlaufen wurden.

Die durchgeführten Scans werden in Datenfiles der Bezeichnung  $ak^*.dat$  gespeichert. Die sogenannten  $ik^*.dat$  Daten verwalten alle  $ak$ -files einer Messreihe. Das  $ik$ -File wird im ersten Schritt in das Programm *IKMITTEL* geladen. Hier kann eine Auswahl der Scans getroffen werden, sodass mögliche Fehlscans ausgeschlossen werden können. Die ausgewählten Scans werden über die Average-Option gemittelt. Man erhält ein  $nk$ -file.

Das nk-file wird im zweiten Schritt in das Programm *NKVIEW* eingelesen. Hier ist es möglich Lösungsmittelkorrekturen vorzunehmen und damit die kohärenten Artefakte (größtenteils) zu entfernen. Zudem wird die Dispersion des Zeitnullpunktes durch Fitten der Daten mit einem Sellmeier-Fit korrigiert. Nach der Korrektur erhält man ein ek-file.

Das ek-file wird im dritten Schritt in das Programm *MULTIVIEW* geladen. Das Programm erlaubt die Darstellung der Daten als wellenlängenabhängige transiente Absorptionsänderungen über die Zeit in Form von Einzeltransienten oder 2D- bzw. 3D-Spektren wie auch die Erzeugung transienter Spektren. Verschiedene Messreihen können miteinander verglichen oder verrechnet werden, beispielsweise zur Berechnungen von Anisotropie oder Spektren im magischen Winkel. Zudem besteht die Möglichkeit über einen Fit eine Modellfunktion an die Daten anzupassen. Die transiente Absorption wird hierbei über ein Ratenmodell dargestellt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Probe eine bestimmte Anzahl  $n$  verschiedener Zustände annehmen kann.

Die Zustände sind durch ihre Absorptionsquerschnitte  $\sigma_i$  spektroskopisch charakterisiert und mit zeitabhängigen Besetzungszahlen  $N_i(t)$  bevölkert. Die Absorptionsänderung ergibt sich zu:

$$\Delta A(\lambda_{Probe}, t) = \sum_{i=1}^n [\sigma_i(\lambda_{Probe}) - \sigma_0(\lambda_{Probe})] N_i(t) \quad (3.20)$$

Will man die Besetzungsdichten  $N_i$  allgemeingültig beschreiben, muss man den Dichtematrixformalismus zur Berechnung benutzen. Mit der Annahme, dass die übergangsrelevanten Moden in einem Zustand thermisch relaxiert sind, bevor es zu einem weiteren Übergang kommt, können Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen aber auch mit Raten beschrieben werden. Die Besetzungsdichten werden über folgendes Gleichungssystem errechnet:

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = - \sum_{j=0}^n k_{ij} N_j(t) \quad (3.21)$$

Hierbei sind  $k_{ij}$  die Ratenkonstanten beim Übergang vom Zustand  $j$  in den Zustand  $i$ . Die Lösung des Gleichungssystems ist eine Summe von Exponentialfunktionen.

$$dN_i(t) = \sum_{j=0}^n M_{ij} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_j}\right) \quad (3.22)$$

Die Kehrwerte der in obiger Gleichung vorkommenden Zeitkonstanten entsprechen den Eigenwerten der Ratenmatrix  $k_{ij}$ . Die Matrix setzt sich spaltenweise aus den Eigenvektoren

der Ratenmatrix zusammen. Eingesetzt in Gleichung 3.20 ergibt dies:

$$\begin{aligned}\Delta A(\lambda_{Probe}) &= \sum_{i=1}^n [\sigma_i(\lambda_{Probe}, t) - \sigma_0(\lambda_{Probe}) \cdot M_{ij}] \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_j}\right) \\ &= \sum_{i=1}^n a_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_j}\right)\end{aligned}\quad (3.23)$$

Gleichung 3.23 zeigt, dass die transienten Absorptionssignale unter den beschriebenen Voraussetzungen durch eine Überlagerung von Exponentialfunktionen beschrieben werden können. Abschließend muss noch berücksichtigt werden, dass die Laserpulse für die Anregung und das Abtasten eine bestimmte Breite aufweisen. Um dem gerecht zu werden, bezieht man die Kreuzkorrelationsfunktion, eine Instrumentenfunktion, mit ein. Die transiente Absorptionsänderung ergibt sich zu:

$$\Delta A(\lambda_{Probe}, t_D) = \sum_{i=1}^n a_i(\lambda_{Probe}) \exp\left(\frac{t_{CC}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t_D}{\tau_i}\right) \cdot \frac{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t_D}{t_{CC}} - \frac{t_{CC}}{2\tau_i}\right)}{2}\quad (3.24)$$

$t_{CC}$  ist hierbei die Kreuzkorrelationsbreite und erf die sogenannte Fehlerfunktion (engl.: error function). Aus den Gewichtsfaktoren  $a_i$  werden abhängig von der Wellenlänge die sogenannten Amplitudenspektren der Zeitkonstante gebildet.

Die Anpassung der Daten wird über den am Institut für Medizinische Optik der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelten URMEL-Algorithmus [100] realisiert. Dieses Programm benutzt die Methode der kleinsten Fehlerquadrate um den besten Satz an Zerfallszeiten  $\tau_i$  und Amplituden  $a_i$  zu bestimmen. Die Anzahl der Zerfallszeiten muss dabei vorgegeben werden.

### 3.4.2 Transiente Absorption im mittelinfraroten Spektralbereich

Will man ultraschnelle Prozesse wie Isomerisierungen, photochemische Abspaltreaktionen oder Peptid- bzw. Proteinantworten auf schnelle Konformationsänderungen struktursensitiv in Echtzeit untersuchen, so erweist sich die Infrarotspektroskopie durch die Möglichkeit ultrakurze Pulse in diesem Frequenzbereich zu generieren als leistungsstarkes Tool. Ein solches Kurzzeitexperiment kann dabei auf vielfältige Art und Weise durchgeführt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, analog zu den in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen transienten Absorptionsmessungen im UV-vis Bereich, die zu untersuchende Reaktion mit einem UV- oder sichtbaren Anregepuls zu starten und sie mit einem spektral breiten IR-Puls abzufragen. In einigen Fällen kann es auch sinnvoll sein einen infraroten Anregungspuls und einen sichtbaren Abtastpuls zu benutzen. Neben dieser sogenannten eindimensionalen Infrarotspektroskopie (1D-IR) wurden in den letzten Jahren in Anlehnung an 2D-NMR-Methoden wie COSY und EXCY zweidimensionale Infrarottechniken (2D-IR) entwickelt. Diese ermöglichen es die Energie der Schwingungs-

eigenzustände, deren Populationen, Strukturinformationen wie Kopplungen sowie die relativen Dipolorientierungen zwischen molekularen Gruppen im Gleichgewicht abzufragen. Darüber hinaus können diese Methoden auch auf Systeme angewendet werden, die sich nicht im Gleichgewicht befinden, was dann als transiente 2D-IR-Spektroskopie (T2D-IR) bezeichnet wird. Diese Experimente benötigen einen Auslöser (Photoschalter, Temperatur- und pH-Sprünge), um beispielsweise eine Konformationsänderung zu einem definierten Zeitpunkt zu induzieren. Eine Übersicht über diese Technik findet man in [101–105].

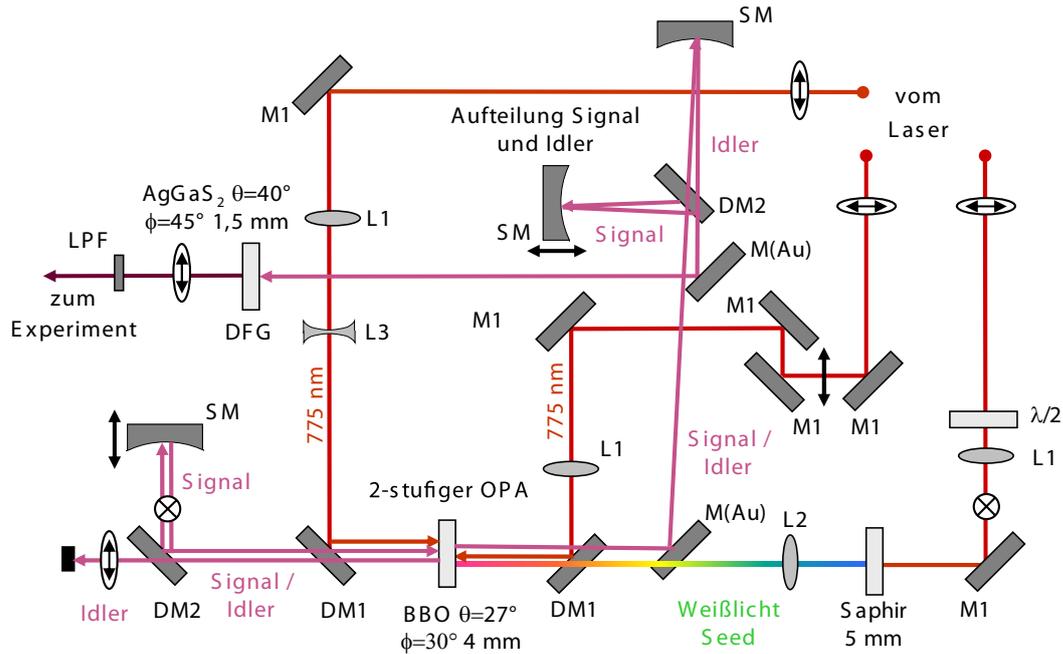
#### Erzeugung kurzer Abtastpulse im mittelinfraroten Spektralbereich

Die in den letzten Jahren am häufigsten benutzten Verfahren zur Generierung ultrakurzer Laserpulse im mittelinfraroten Bereich verwenden optisch parametrische Verstärker (OPA, engl. optical parametric amplifier) [106]. Bei diesem Prozess treffen ein schwacher Seed-Puls und ein intensiver Pump-Puls in kollinear Anordnung auf einen nichtlinearen Kristall. Das Pumpphoton wird dabei in ein Photon der Seed-Wellenlänge, das sogenannte Signalphoton, und in ein langwelligeres Photon, genannt Idler, aufgespalten. Es muss sowohl die Phasenanpassungsbedingung als auch Energieerhaltung gelten. Wie schon im Falle des NOPAs diskutiert, wird, wenn Weisslicht als Seedstrahlung eingesetzt wird, je nach zeitlichem Zusammentreffen von Seed- und Pump-Puls eine zu verstärkende Wellenlänge ausgewählt. Ein Vorteil der kollinearen Anordnung ist die hohe Effizienz. Jedoch führen die unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten von Signal und Idler im nichtlinearen Kristall dazu, dass beide Pulse räumlich auseinanderlaufen. Da sich die Pulse beim Durchlaufen des Kristalls gegenseitig immer neu generieren, führt dies zu einer Verlängerung der Signal- und Idler-Pulse. Die Erzeugung mittelinfraroter Pulse kann nun vielseitig ablaufen. Eine Möglichkeit besteht in der direkten Verwendung der Idlerwellenlänge eines mit  $0,8\ \mu\text{m}$  gepumpten OPAs. Allerdings ist der normalerweise benutzte BBO-Kristall für diese Fälle nur mäßig geeignet, da er bei Wellenlängen  $< 3\ \mu\text{m}$  nicht mehr transparent ist. Der Durchstimmbarkeitsbereich kann durch die Benutzung von anderen nichtlinearen Kristallen wie  $\text{KTiOPO}_4$  [107],  $\text{KNbO}_3$  [108] oder  $\text{LiNbO}_3$  [109] auf Wellenlängen  $> 4\ \mu\text{m}$  erweitert werden. Aber auch in diesen Systemen ist er aufgrund hoher Fehlanpassung der Gruppengeschwindigkeit zwischen den Signal- und Idlerstrahlen auf  $\approx 5\ \mu\text{m}$  beschränkt. Weitere nichtlineare Kristalle mit erweiterter IR-Transparenz sind zwar erhältlich, man stößt aber immer wieder auf das Problem, dass aufgrund von Restabsorption oder des Fehlens von Phasenanpassung die Pumpwellenlängen weiter im Nahinfraroten liegen müssen.

Ein alternativer, in dieser Arbeit benutzter Weg mittelinfrarote Pulse zu erzeugen, liegt in der Differenzfrequenzerzeugung zwischen den Signal- und Idlerphotonen des OPAs. Dieser Prozess wird zumeist in  $\text{AgGaS}_2$ -Kristallen durchgeführt. Eine kontinuierliche Durchstimmbarkeit von  $2,4\ \mu\text{m}$  bis  $12\ \mu\text{m}$  wird hierdurch möglich gemacht [110–112]. Ein Nachteil dieser Methodik sind die signifikant kleineren Ausgangsleistungen, die jedoch für Anreg-Abtast-Spektroskopie völlig ausreichend sind.

Eine weitere Technik zur Erzeugung der gewünschten Pulse ist die Fokussierung eines einzelnen ultrakurzen Pulses in ein elektrooptisches Material (GaAs oder GaSe). Diese Technik stammt aus der Erzeugung von ferninfraroter Strahlung mit Frequenzen im Bereich einiger Terahertz [113, 114] und wurde auch auf den mittelinfraroten Bereich erweitert [115].

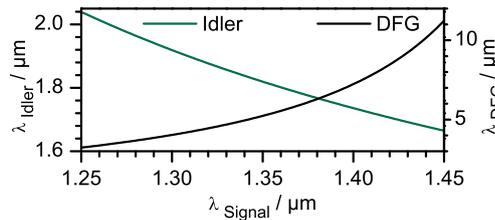
Der in dieser Arbeit benutzte optische Aufbau ist an den in Referenz [112] diskutierten angelehnt. Abbildung 3.6 gibt eine schematische Darstellung.



**Abbildung 3.6:** Schematischer Aufbau der Erzeugung kurzer Laserpulse im mittelinfraroten Spektralbereich. Die Polarisationen sind sinnbildlich dargestellt. M = Fundamentalspiegel, M(Au) = Goldspiegel, DM = Dichroitischer Spiegel, SM = Hohlspiegel, L1 = Konvexlinse, L2 Achromat, L3 = Konkavlinse, LPF = Langpassfilter

Im Detail: Die erste parametrische Stufe verstärkt den IR-Anteil des in einem Saphir-Substrat erzeugten Weißlichts. Als Pumpstrahl dient hierbei die Laserfundamentale. Man erhält für den Fall, dass der OPA-Kristall senkrecht zu den einfallenden Strahlen steht, Signal- und Idlerwellen in einem Wellenlängenbereich von etwa  $1,3 \mu\text{m}$  bzw.  $1,9 \mu\text{m}$ . Um eine höhere Stabilität und Intensität zu erhalten wird ein zweiter Verstärkungsprozess angeschlossen. Die Idlerwellenlänge wird hierzu nicht benötigt und über einen dichroitischen Spiegel verworfen. Die Signalwellenlänge dient für diese zweite Verstärkungsstufe als Seedstrahl und die Laserfundamentale erneut als Pumpquelle.

Die im zweiten Durchlauf erhaltenen Signal- und Idlerwellen werden zur Erzeugung mittelinfraroter Pulse einem Differenzfrequenzmischprozess in einem Silberthiogalatkristall unterzogen. Die Wellenlänge kann durch Verkippung der OPA- und DFG-Kristalle sowie Anpassung der zeitlichen Überlagerung in einem Bereich von  $4 - 10 \mu\text{m}$  durchgestimmt



**Abbildung 3.7:** Abhängigkeit der Differenzfrequenzwellenlänge von den eingestrahlten Signal- und Idlerfrequenzen

werden. Abbildung 3.7 zeigt die Abhängigkeit der Differenzfrequenzwellenlänge von den eingestrahlten Signal- und Idlerfrequenzen. Mit Hilfe eines Germaniumbandkantenfilters werden unkonvertierte Reste der Signal- und Idlerstrahlen abgetrennt. Die spektrale Breite der Abtast-Pulse beträgt in etwa  $100 \text{ cm}^{-1}$ .

### Der Messplatz

Um die für die Anreg-Abtast-Spektroskopie grundlegende zeitliche Verzögerung beider Pulse gegeneinander zu erlangen wird im vorliegenden Fall der Abtastpuls zweifach gefaltet über eine verfahrbare Umlenkstrecke geleitet. Mit Hilfe von Parabolspiegeln wird er anschließend zusammen mit dem Anregstrahl in die Probe fokussiert. Hierbei gilt, dass das Überlappungsvolumen umso größer ist, je kleiner der Winkel zwischen ihnen ist. Der Paraboloid für die Abtast-Strahlung enthält daher eine Bohrung, durch die der Anreg-Puls geführt wird. Um kurzzeitige Schwankungen der Laserintensität zu eliminieren, besteht zudem die Möglichkeit mit einem Referenz-Abtastpuls zu arbeiten. Der Referenzpuls wird mit Hilfe eines gekielten  $\text{CaF}_2$ -Substrats erzeugt und so in das Spektrometer geleitet, dass er keinen räumlichen Überlapp mit dem Anregpuls besitzt, aber durch die Probe läuft. Ein Parabolspiegel hinter der Probe kollimiert Abtast- und Referenz-Strahl, ein weiterer fokussiert sie in das Spektrometer. Der in normaler Luft enthaltene Wasserdampf wie auch  $\text{CO}_2$ -Gehalt führen dazu, dass durch die starken Absorptionsbanden im zu untersuchenden Spektralbereich die Intensität des Abtaststrahls erniedrigt wird. Zudem kann es dazu kommen, dass der Puls durch die scharfen Absorptionsbanden spektral zerschnitten wird. Der komplette Messplatz muss daher mit Trockenluft gespült werden. Messungen wurden typischerweise ab einem Taupunkt von  $-30$  bis  $-40^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Die m-IR Abtast-Pulse werden zunächst im Spektrometer (Chromex, Sure-Spektrum 250is) über ein Gitter spektral divergiert. Die Detektion und Digitalisierung wird mit Hilfe eines Boxcar-Integratorsystems mit A/D-Wandler (Infrared Systems Development Corp., IR-6416 Multi-Channel Laser Pulse Spectroscopy System) durchgeführt. Der spektral divergierte Puls wird linear dispersiert auf ein 64-elementiges HgCdTe-Detektorarray fokussiert, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Die Elemente liegen als Doppelzeile vor. Hiervon dienen 32 zur Detektion des Abtast-Pulses und die übrigen 32 für den Referenz-Abtast-Puls. Das Signal wird vorverstärkt, integriert, anschließend über einen 16 Bit A/D-Wandler digitalisiert und im Computer weiterverarbeitet. Man erreicht für

das verwendete Gitter eine spektrale Auflösung von 11,3 nm / Kanal (150 Linien / mm).

Zur Datenaufnahme wird das von Karsten Neumann entwickelte [116] auf LabView basierende Programm FIST (engl. femtosecond infrared spectrometer toolkit) verwendet. Dieses nimmt vor der Aufzeichnung eines Scans (ein Scan ist definiert als das einmalige Abfahren der Verzögerungsstrecke) durch Schließen eines Shutters das Dunkelstromsignal  $I_{BG}$  für  $N$  Laserschüsse auf.

$$\bar{I}_{BG}(\lambda) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N I_{BG,j}(\lambda) \quad (3.25)$$

Für jeden Kanal  $\lambda$  und jede Verzögerungszeit  $t_D$  werden  $N$  Laserpulse pro Datenpunkt aufgenommen und aufsummiert. Die Signalintensität wird jeweils um das Dunkelstromsignal korrigiert.

$$\bar{I}(\lambda, t_D) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_i(\lambda, t_D) - \bar{I}_{BG}(\lambda) \quad (3.26)$$

Um nun Transmissionsänderungen zu messen wird durch Abblocken jedes zweiten Anregepulses, technisch realisiert über ein Unterbrecherrad, abwechselnd eine Messung mit ( $\bar{I}_P$ ) und ohne Anregung ( $\bar{I}_{OP}$ ) durchgeführt. Die Benutzung des Unterbrecherrads hat den Vorteil, dass mittelfristige Schwankungen in der Laserleistung hierdurch keinen Einfluss auf das Signal haben.

$$\Delta T = \frac{\bar{I}_P(\lambda, t_D)}{\bar{I}_{OP}(\lambda, t_D)} \quad (3.27)$$

Bei Benutzung der referenzierten Messmethode ergibt sich die Transmissionsänderung zu:

$$\Delta T^{ref} = \frac{\bar{I}_P(\lambda, t_D)}{\bar{I}_{OP}(\lambda, t_D)} \cdot \frac{\bar{I}_{OP}^{ref}(\lambda, t_D)}{\bar{I}_P^{ref}(\lambda, t_D)} \quad (3.28)$$

Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ergibt sich für die Absorptionsänderung:

$$\Delta A^{ref} = -\log_{10} \left( \frac{\bar{I}_P(\lambda, t_D)}{\bar{I}_{OP}(\lambda, t_D)} \cdot \frac{\bar{I}_{OP}^{ref}(\lambda, t_D)}{\bar{I}_P^{ref}(\lambda, t_D)} \right) \quad (3.29)$$

### Artefakte um den Zeitnullpunkt

Ähnlich wie bei der Anreg-Abtast-Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich treten auch beim Abtasten mit mittelinfraroten Pulsen kohärente Effekte um den Zeitnullpunkt auf. Die wichtigsten sollen nun nachfolgend dargestellt werden.

#### *Wellenlängenabhängigkeit des Zeitnullpunkts*

Im vorliegenden Experiment sind die Abtastpulse durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion geschirpt. Dies bedeutet, dass die Frequenzen nicht gleichmäßig über den gesamten Puls verteilt sind, sondern dispergiert vorliegen. Aufgrund dessen erreichen die verschiedenen Frequenzen des Pulses die Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Man beobachtet also eine Frequenzabhängigkeit des Zeitnullpunktes. Der Zeitnullpunkt kann vor der Auswertung der Daten über die Anpassung einer Dispersionskurve (Sellmeier Fit) korrigiert werden. Diese Korrektur wird aber in den transienten Absorptionmessungen im infraroten Spektralbereich dadurch erschwert, dass noch weitere kohärente Effekte auftreten.

#### *Kreuzphasenmodulation*

Die Kreuzphasenmodulation (XPM, engl.: cross phase modulation) ist ein nichtlinearer Effekt dritter Ordnung, der beim Zusammentreffen zweier Laserstrahlen entsteht [117, 118]. Hierbei ruft die Intensität des ersten Strahls eine Phasenänderung des zweiten Strahls hervor. Dies kann auch als nichtlineare Änderung des Brechungsindex beschrieben werden.

$$\Delta n^{(2)} \propto n_2 I^{(1)} \quad (3.30)$$

$n_2$  ist hier der nichtlineare Brechungsindex, der zusammen mit der Intensität des ersten Strahls  $I^{(1)}$  die Änderung im Brechungsindex des zweiten Strahls  $n^{(2)}$  induziert. Dies gilt für die Annahme, dass beide Strahlen parallel polarisiert sind. Da die Kreuzphasenmodulation bei Überlagerung des Anreg- und Abtastpuls stattfindet, sind die Messdaten um den Zeitnullpunkt von diesem Effekt überlagert. Der Effekt kann aber durch Verringerung der Anregungsintensität, oder durch Messung in senkrechter Polarisation reduziert werden.

#### *Gestörter freier Induktionszerfall*

Der gestörte freie Induktionszerfall (PFID, engl.: perturbed free induction decay) ist ein kohärenter Effekt, der bei Anreg-Abtast-Spektroskopie im infraroten Spektralbereich vor dem Zeitnullpunkt auftritt und wie folgt erklärt werden kann: Wechselwirkt ein mit einem molekularen Übergang resonanter Puls mit der zu untersuchenden Probe, so wird eine kohärente Polarisation erzeugt, die mit der Dephasierungszeit  $T_2$  zerfällt. Dieser Zerfall ist unter dem Begriff freier Induktionszerfall bekannt. Wenn nun während dieses Zerfalls die Polarisation durch einen weiteren Puls, in diesem Fall der Anregpuls, gestört wird, bewirkt dies eine Änderung in der Transmission der Probe, die gestörter

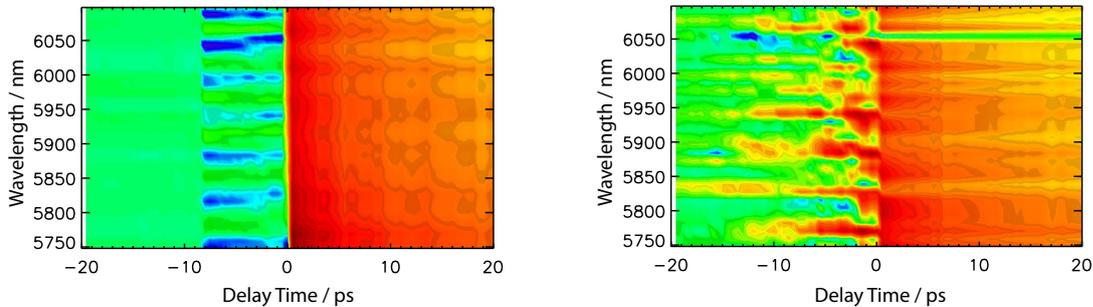
freier Induktionszerfall genannt wird [119, 120]. Da die Dephasierungszeit  $T_2$  einer Absorptionsbande proportional zur ihrer inversen Bandbreite  $\Delta\tilde{\nu}$  ist,

$$T_2 = \frac{1}{\pi c \Delta\tilde{\nu}} \quad (3.31)$$

gibt das PFID-Signal Auskunft über die Bandbreite der zugehörigen Schwingung. Zudem kann über die spektrale Position dieses Signals die Zentralwellenlänge der gebleichten Absorptionsbande bestimmt werden.

### *Fabry Perot Etalon*

Bei Messungen an Halbleitersubstraten zur Bestimmung des Zeitnullpunktes treten im beobachteten transienten Absorptionsspektrum häufig sich periodisch ändernde Signaturen auf, die sich auf Interferenzen zurückführen lassen.



**Abbildung 3.8:** Zweidimensionale Darstellung einer ZnSe-Messung bei Verzögerungszeiten von -20 bis 20 ps. Der Anstieg nach  $t_0$  zeigt deutlich das im Halbleitermaterial erzeugte Signal des freien Elektrons. Zu negativen Verzögerungszeiten ist in der linken Abbildung der oben beschriebene Fabry Perot Etalon zu sehen. Das rechte Spektrum ist bis auf den Fakt, dass der Messplatz nur ungenügend mit Trockenluft gespült war, unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Die Auswirkungen auf die transienten Spektren sind deutlich erkennbar.

Die Entstehung dieser lässt sich wie folgt erklären: Wenn eine Lichtwelle auf eine planparallele Platte mit der Schichtdicke  $d$  und dem Brechungsindex  $n$  trifft, wird diese an jeder Grenzschicht (Vorderseite, Rückseite) zum einen mit dem Reflexionskoeffizienten  $r$  reflektiert, zum anderen mit dem Transmissionskoeffizienten  $t$  durchgelassen. Der Laserstrahl kann diesen Effekt wiederholt erfahren. Durch die Phasenkohärenz des Lichtes können die einzelnen Teilwellen konstruktiv oder destruktiv überlagern. Es ergibt sich hierdurch folgende Beziehung:

$$2n \cdot d \cdot \cos \theta = m \cdot \lambda \quad (3.32)$$

$\theta$  ist hierbei der Eintrittswinkel des Strahls und  $m$  die Ordnung der Interferenz. Der beobachtete Effekt wird als Fabry Perot Etalon bezeichnet.

#### Durchführung und Auswertung der Messung

Der räumliche und zeitliche Überlapp von Anreg- und Abtastpuls wird vor der eigentlichen Messung grob mit Hilfe einer Lochblende (Pinhole) voreingestellt. Um den genauen Zeitnullpunkt zu bestimmen wird ähnlich wie bei transienten Absorptionsmessungen im Sichtbaren nach dieser Voreinstellung eine Test-Probe positioniert, die unter den experimentellen Bedingungen sehr große Signale ergibt. Im Falle von Anreg-Abtast-Spektroskopie im mittelinfraroten Spektralbereich sind Halbleitermaterialien wie Silizium oder ZnSe das Mittel der Wahl, da diese jegliche Strahlung mit höherer Energie als die Bandlücke absorbieren und hierdurch Elektronen ins Leitungsband angehoben werden. Da den freien Ladungsträgern im Leitungsband ein Kontinuum an erlaubten Zuständen zur Verfügung steht, resultiert eine Absorptionzunahme über einen sehr breiten Bereich, der spektral im Mittelinfraroten angesiedelt ist. Im Falle von Siliziumsubstrat bleibt das Signal über mehrere Nanosekunden erhalten, für ZnSe im Zeitbereich weniger 100 ps. Die Absorptionzunahme kann mit einer Errorfunktion beschrieben werden, deren Wendepunkt dem Zeitnullpunkt entspricht.

Nachdem der Zeitnullpunkt bestimmt wurde, wird die eigentliche Probe in den Strahlengang gestellt. Das Küvettendesign besteht aus zwei 2 mm dicken  $\text{CaF}_2$  Fenstern, zwischen denen die Probe über einen Teflon-Abstandshalter (Schichtdicke zwischen  $50 \mu\text{m}$  und  $200 \mu\text{m}$ ) gelagert ist. Der Austausch des Probenvolumens zwischen zwei Laserschüssen kann einerseits dadurch gewährleistet werden, dass in dieses Design zwei Kanäle integriert werden, sodass die Probe durchgepumpt werden kann, oder aber durch Rotation und gleichzeitige translatorische Bewegung. In der vorliegenden Arbeit wurde letzteres benutzt. Bei intensiven transienten Signalen kann der Überlapp der Anreg- und Abtastpulse auf das Probensignal optimiert werden.

Zur Auswertung wird das auf Seite 33 beschriebene auf IDL 6.0 basierende Programm z20 benutzt. Auf die Korrektur der kohärenten Artefakte um den Zeitnullpunkt durch die Subtraktion des Lösungsmittelsignals wurde verzichtet, da die Residuen immer noch signifikante Einflüsse dieser Artefakte aufweisen. Die beschriebene Auswertung über die Summe an Exponentialfunktionen wurde daher auf Verzögerungszeiten  $> 0,3 \text{ ps}$  beschränkt.

### 3.5 Fluoreszenz-Aufwärtskonvertierung

Um selektiv Information über die Lebensdauer angeregter Zustände zu erhalten, ist die zeitaufgelöste Fluoreszenz-Spektroskopie das Mittel der Wahl. Da die Lebensdauer im Allgemeinen im Bereich weniger hundert Femtosekunden bis hin zu einigen zehn Nanosekunden (Fluoreszenzfarbstoffe) liegt, benötigt man Methoden, die eine solche Zeitauflösung bereitstellen. Für den Zeitbereich  $> 100 \text{ ps}$  wird heutzutage routinemäßig ein als *Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen* (TCSPC, engl. time-correlated single photon counting) bezeichnetes Experiment benutzt. Dieses rekonstruiert das zeitliche Abklingen der Fluoreszenz aus der Einzelzählstatistik der eingehenden Photonen. Für die Auflösung schnellerer Fluoreszenzzerfälle verwendet man Methoden, die auf dem

Prinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie basieren. Hierbei wird die Probe mit einem kurzen Anregpuls in den angeregten Zustand gehoben. Die Photonen der resultierenden spontanen Fluoreszenz interagieren über einen nichtlinearen Prozess in einem geeigneten Medium mit einem zweiten Puls, dem Gatepuls, auch Torpuls genannt. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz kann nun analog zur transienten Absorptionstechnik durch die zeitliche Verzögerung des Gatepulses abgetastet werden. Der für die Detektion wichtige nichtlineare Prozess kann auf zwei Arten durchgeführt werden. Beim sogenannten *Kerr Gating* werden die Fluoreszenz und der Gatepuls in ein Kerr-Medium, z.B. Quarzglas, eingestrahlt. Der Gatepuls erzeugt eine transiente Anisotropie, die die linear polarisierte Fluoreszenz in einen elliptischen Polarisationszustand überführt. Durch einen Polarisationsfilter kann das Fluoreszenzlicht abgetrennt werden, wobei es nur bei zeitlichem Überlapp mit dem Gatepuls auf einer CCD (Charge-coupled Device)-Zeile abgebildet wird. Die andere Möglichkeit ultraschnelle Fluoreszenzen aufzunehmen besteht in der Fluoreszenz-Aufwärtskonvertierung. Hierbei wird die Fluoreszenz mit dem Gatepuls in einem nichtlinearen Kristall überlappt. Bei geeignetem Winkel kann die Phasenanpassung für den Prozess der Summenfrequenzgenerierung (Siehe hierzu auch Kapitel 3.1) eingestellt werden. Ein kleiner und zeitlich definierter Teil der Fluoreszenzphotonen wird hierdurch spektral vom Rest der Fluoreszenz abgetrennt und kann so selektiv detektiert werden. Die Zeitauflösung dieser Methode ist durch die Kreuzkorrelation zwischen Anregungs- und Gatepuls gegeben, die sich leicht durch Messung des Aufwärtskonvertierungssignals der Anregung bestimmen lässt.

Gegenüber dem Kerr-Schalter hat die Fluoreszenzaufwärtskonvertierung den Nachteil, dass pro Messung nur eine Wellenlänge und nicht das ganze Fluoreszenzspektrum gleichzeitig aufgenommen werden kann. Man hat jedoch den Vorteil, dass man nicht den enormen Streulichtuntergrund, der vom Gatepuls herrührt, unterdrücken muss.

## Benutzter Aufbau

In dem in dieser Arbeit benutzten Aufbau stand das auf Seite 24 beschriebene Spektra Physics Lasersystem, mit in einem Bereich von 760 nm - 840 nm durchstimmbaren Laserpulsen von ca. 150 fs, als Pulsquelle zur Verfügung.

Die Anregung kann dabei, wie schon bei den transienten Absorptionsmethoden beschrieben (Kapitel 3.4.1), durch vielfältige nichtlineare Methoden wie dem NOPA, der Frequenzverdoppelung oder der Summenfrequenz aus NOPA und Laserfundamentalen gewährleistet werden. Es wird mit Pulsenergien von 100 nJ - 500 nJ und einem Fokaldurchmesser von etwa 200  $\mu\text{m}$  in die Probe fokussiert. Die Probe wird während der Messung transversal bewegt um die Akkumulation von Photoprodukten zu verhindern. Über einen hinter der Probe befindlichen Strahlstopper wird das transmittierte Anregungslicht geblockt. Zudem kann je nach Probe das Streulicht durch Buntglasfilter unterdrückt werden. Die Fluoreszenz wird durch einen Off-Axis-Paraboloiden aufgefangen und durch einen weiteren baugleichen Paraboloiden in den Aufwärtskonvertierungskristall (BBO, z.B.  $\theta = 51^\circ$ ,  $d = 0,1\text{mm}$ ) fokussiert. In diesem wird die Fluoreszenz mit dem Gatepuls (Laserfundamentale, 120  $\mu\text{J}$ ) in einem Winkel von  $13,5^\circ$  überlagert [121]. Das erhaltene

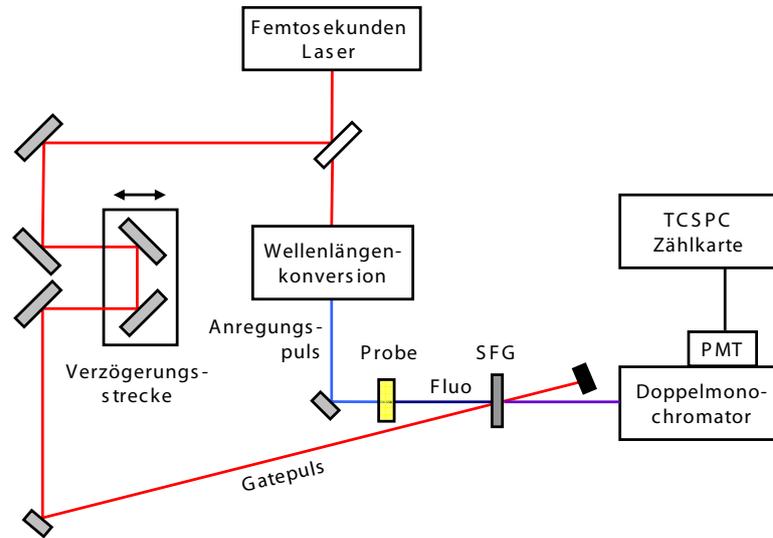


Abbildung 3.9: Schematischer Aufbau der Fluoreszenzaufwärtskonvertierung.

Summenfrequenzsignal wird durch eine Linse parallelisiert und durch eine Modenblende räumlich von dem Anregungs- und Gatepuls getrennt. Über eine weitere Linse werden die aufwärtskonvertierten Photonen in den Doppelmonochromator fokussiert. Die Detektion entspricht der eines Einzelphotonenexperiments (Becker und Hickl, MSA-1000). Eine Integration über das Signal ergibt die aufwärtskonvertierte Fluoreszenzintensität. Die Zeitauflösung des Experiments wird wie oben beschrieben über eine Verzögerungsstrecke (Physik-Instrumente, M 531 DD) gewährleistet. Im vorliegenden Fall wird der Strahlengang des Gatepulses auf einer maximalen Verschiebestrecke von 30 cm (entspricht 2 ns) variiert. Hierbei können Daten sowohl auf einer linearen, als auch logarithmischen Zeitskala aufgenommen werden.

### Auswertung der Messung

Zur Auswertung des während der Messung gemittelten Fluoreszenzsignals wird das Unterprogramm MULTIVIEW aus dem auf IDL 6.0 basierenden Programmpaket z20 benutzt. Hier können zur Datenevaluation dem Signal eine Summe von Exponentialfunktionen angepasst werden.

$$\Delta A(\lambda_{Probe}, t_D) = \sum_{i=1} a_i(\lambda_{Probe}) \exp\left(\frac{t_{CC}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t_D}{\tau_i}\right) \cdot \frac{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t_D}{t_{CC}} - \frac{t_{CC}}{2\tau_i}\right)}{2} \quad (3.33)$$

Der Anstieg bei  $t=0$  wird über die Errorfunktion angepasst, die abhängig von der Kreuzkorrelationsbreite  $t_{CC}$  zwischen Anregungs- und Gatepuls ist. Zur Bestimmung der Kreuzkorrelationsbreite wird während der gesamten Messung die Autokorrelation (Details

siehe [116]) des Gatepulses mitbestimmt und in die Auswertung als invariabler Faktor übernommen.

Bei Annahme zweier annähernd gaußförmiger Pulse kann die Kreuzkorrelation auch mit einer Gaußfunktion beschrieben werden.

$$f(t) = \exp \frac{-t^2}{2w^2} \quad (3.34)$$

In der gewählten Definition dieser Funktion entspricht  $w$  der Standardabweichung  $\sigma$ . Definiert man die Kreuzkorrelationsbreite als Halbwertsbreite (FWHM engl., full width at half maximum), so ergibt sich diese zu:

$$FWHM = t_{CC} = 2 \cdot \sqrt{\ln 4} \cdot w \approx 2,35 \cdot w \quad (3.35)$$



# 4 Laserblitzlichtphotolyse

*So einfach wie möglich. Aber nicht einfacher.*

—————  
*Albert Einstein*

Die schon 1949 von Norrish und Porter [122] eingeführte Blitzlichtphotolyse ist ein häufig eingesetztes analytisches Verfahren zur Untersuchung der Kinetik von kurzlebigen Zwischenprodukten photochemischer Reaktionen bis in den Zeitbereich weniger Nanosekunden ( $10^{-9}$  s). Mittels eines Laserblitzes werden dabei Spezies erzeugt und ihre Konzentration via optischer Absorption in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die Zeitauflösung der Messung hängt im Wesentlichen von der Bandbreite des Detektionssystems sowie der Pulsdauer der verwendeten Pump-Lichtquelle ab. Aus dem zeitlichen Verlauf der Absorption lassen sich durch die Anpassung eines kinetischen Modells die Zeitkonstanten der ablaufenden Prozesse ermitteln. Aus Messungen bei verschiedenen Temperaturen ergeben sich deren Aktivierungsenergien.

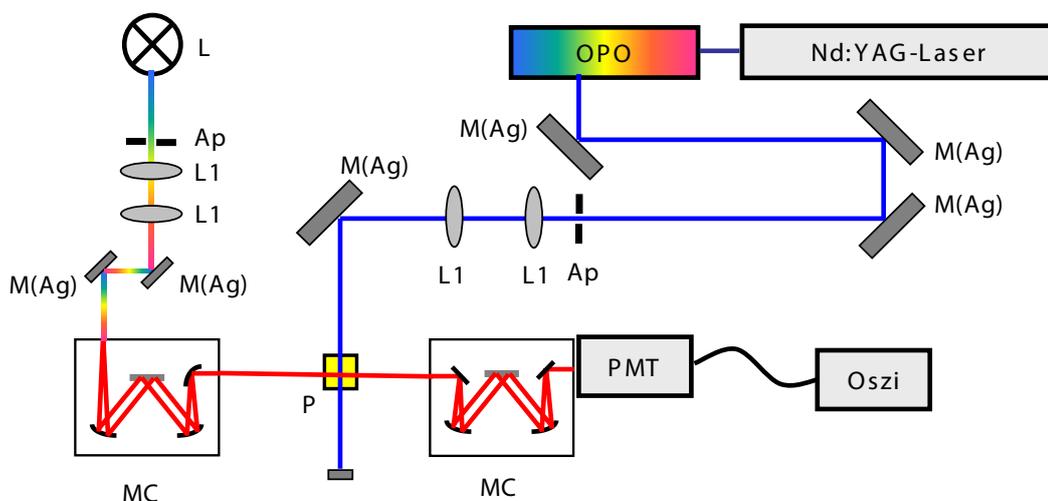
## 4.1 Experimenteller Aufbau

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Blitzlichtphotolyse-Aufbau mit den in Abbildung 4.1 dargestellten Komponenten verwendet.

### Anregungsquelle

Als Pumpquelle dient ein Nd:YAG-Laser (Spitlight 600, Innolas Laser GmbH). Hierbei handelt es sich um einen Festkörperlaser, bei dem das aktive Medium aus mit  $\text{Nd}^{3+}$  dotiertem Yttrium-Aluminium-Granat (YAG;  $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ ) besteht. Etwa 1% der  $\text{Y}^{3+}$ -Ionen wurden durch  $\text{Nd}^{3+}$  ersetzt. Höhere Konzentrationen an  $\text{Nd}^{3+}$ -Ionen führen zum Quenchen des obersten angeregten Zustands über Aufwärtskonvertierungsprozesse.

Die optischen Eigenschaften des als Nd:YAG bezeichneten Materials werden von den  $\text{Nd}^{3+}$ -4f-Elektronen bestimmt. Diese koppeln nur relativ schwach an das Gitter des Granatkristalls. Die elektronischen Zustände werden daher in guter Näherung durch die LS-Kopplung und die Hundschen Regeln beschrieben [123]. Hiernach koppeln die drei f-Elektronen des  $\text{Nd}^{3+}$ -Ions im Grundzustand zu dem maximalen Gesamtspin  $S = 3/2$  und dem Gesamt-Bahndrehimpuls  $L = 3 + 2 + 1 = 6$ . Aus dem  $^4\text{I}$ -Multipllett wird wegen der weniger als halb besetzten Schale der Grundzustand bei  $J = 9/2$  erwartet. Durch die anisotropen Kristallfelder der lokalen Umgebung wird zudem die magnetische Entartung in der m-Quantenzahl aufgehoben. Die Kopplung an die Gitterschwingungen führt schließlich zu homogen verbreiterten Multipletts. Die strengen Dipolauswahlregeln des

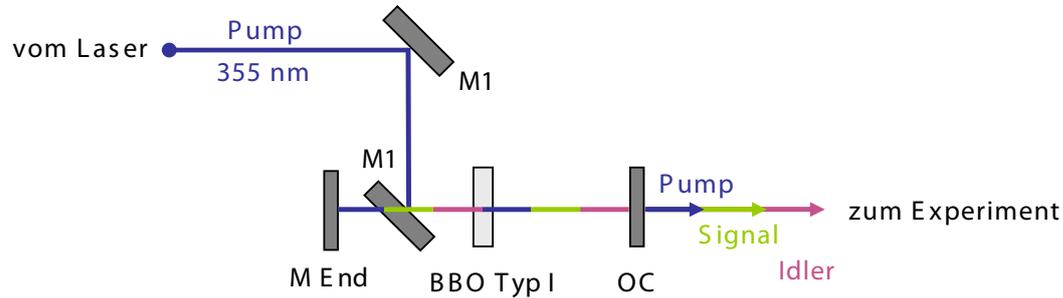


**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des Blitzlichtphotolyseaufbaus. Ap = Blende, L = Lampe, L1 = Konvexlinse, M(Ag) = Silberspiegel, MC = Monochromator, OPO = optisch parametrischer Oszillator, Oszi = Speicheroszilloskop, P = Probe, PMT = Photomultiplier

freien Atoms ( $\Delta l = \pm 1$ ) werden durch die (schwache) Kopplung der elektronischen Zustände an die Umgebung des elektrischen Kristallfeldes aufgehoben, was eine Mischung von  $4f$  und  $5d$  - Zuständen verursacht. Die Energie-Verschiebung durch diese Wechselwirkung ist eher gering. Beim strahlenden Zerfall überwiegt aber die Dipolkopplung und verkürzt die Lebensdauern der Zustände dramatisch in den Bereich einiger  $\mu\text{s}$ . Man beobachtet daher intensive Absorption und Fluoreszenz auf Übergängen zwischen den Feinstruktur-Niveaus.

Nd:YAG ist bis auf die Ausnahme des  $946\text{ nm}$ -Übergangs ein Vier-Niveau-Lasersystem. Gewöhnlich wird mit einer Pumpwellenlänge von  $808\text{ nm}$  gearbeitet. Nach Anregung wird das  ${}^4F_{3/2}$ -Niveau sehr schnell durch phononische Relaxation bevölkert. Die Lebensdauer dieses Laserniveaus wird zu  $98\%$  durch strahlende Zerfälle bestimmt und beträgt  $240\ \mu\text{s}$ . Durch eine Anregung mit  $869\text{ nm}$  kann aber auch direkt das  ${}^4F_{3/2}$ -Laser-Niveau bevölkert werden. Der intensivste Laserübergang findet im Übergang zum  ${}^4I_{11/2}$ -Zustand mit einer Wellenlänge von  $1064\text{ nm}$  statt. Das untere  ${}^4I_{11/2}$ -Niveau wird ebenfalls schnell entleert. Weiterhin ist es auch möglich, den Nd:YAG-Laser auf länger- und kürzerwelligen Frequenzen ( $946\text{ nm}$ ,  $1123\text{ nm}$ ,  $1319\text{ nm}$ ) zu betreiben. Hierfür muss allerdings die intensive  $1064\text{ nm}$ -Laserlinie im Resonator gefiltert werden. Über Multiphotonenemission werden die Populationen in den  ${}^4I_{13/2}$ - und  ${}^4I_{15}$ -Niveaus zum Grundzustand  ${}^4I_{9/2}$  transferiert. Da die Lebensdauer der ersteren Zustände wesentlich geringer sind als die des letzten, ist die Besetzung in diesen Zuständen vernachlässigbar klein.

Durch die Entwicklungen der letzten Jahrzehnte gibt es Nd:YAG-Laser in zahllosen technischen Varianten. Das Pumpen des Kristalls kann mit Diodenlasern oder Hochdruck-Xenonlampen bewerkstelligt werden. Zudem ist es möglich den Laser sowohl kontinuierlich (CW, für engl. continuous wave), wie auch gepulst zu betreiben. Puls-



**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung des optisch parametrischen Oszillators. M1 = Pump Spiegel, M End = Resonatorendspiegel, OC = Auskopplungsspiegel

betrieb wird hierbei entweder durch gepulstes Pumpen oder Güteschaltung (Q-Switch) erzielt. Die Güteschaltung kann hierbei aktiv z.B. durch Pockelszellen oder akustooptische Modulatoren, sowie auch passiv durch sättigbare Absorber betrieben werden.

In dem in dieser Arbeit verwendeten Nd:YAG-Laser wird der Oszillator über eine Xenonblitzlampe gepumpt. Die aktive Güteschaltung wird über eine Kombination aus Pockelszelle (KD\*P-Kristall) und Polarisator (zwischen Pockelszelle und Laserstab im Brewster-Winkel) realisiert. Zusätzlich ist zwischen dem YAG-Stab und der Auskopplungseinheit ein mechanischer Shutter angebracht, der über einen Drehmagneten betrieben wird. Dieser ermöglicht den Laserbetrieb mit unterschiedlichen Wiederholraten, indem er den Laseroutput über eine externe Steuerung blockt. Zur weiteren Erhöhung der Ausgangsleistung wird der Laserstrahl anschließend in einen Verstärker eingekoppelt. Zum Betrieb des optisch parametrischen Oszillators wird die Ausgangswellenlänge des Lasers in einem nichtlinearen Kristall (KD\*P, Typ I) auf eine Ausgangswellenlänge von 355 nm frequenzverdreifacht.

## Der optisch parametrische Oszillator

Die parametrische Erzeugung von durchstimmbarer kohärenter Strahlung über sehr weite Wellenlängenbereiche ist von großem Interesse. Der optisch parametrische Oszillator (engl. optical parametric oscillator, OPO) wird daher schon seit langem für diesen Zweck benutzt. Ein optisch parametrischer Oszillator besteht aus einem nichtlinearen Kristall innerhalb eines optischen Resonators. Ein Pumpstrahl der Frequenz  $\nu_{pump}$  generiert unter Beachtung von Energie- und Impulserhaltung über einen parametrischen Prozess (Siehe hierzu auch Kapitel 3.1) Photonen der Frequenzen  $\nu_{signal}$  und  $\nu_{idler}$ . Da die Verstärkung abhängig von der Phasenfehlanpassung  $\Delta k$  ist, kann man die Wellenlängen der Signal- und Idlerwelle durch Variation des Kristallwinkels durchstimmen.

Im vorliegenden Fall wurde ein optisch parametrischer Oszillator der Firma GWU Lasertechnik (Preciscan) benutzt. Dieser benutzt als Pumpquelle den frequenzverdreifachten (355 nm) Puls des Nd:YAG-Lasers. Die weiteren Einstellungen, wie die Kristallwinkel oder den Austausch geeigneter Kristalle, wurde automatisiert über ein Computerprogramm betrieben. Es konnten Signalwellenlängen in einem Bereich von 410 nm – 709 nm und

Idlerwellenlängen von 710 nm – 2500 nm erzielt werden. Die mittlere Pulslänge liegt im Bereich von 20 ns. Aufgrund großer Divergenz in vertikaler Strahlrichtung wird ein Teil des Laserspots mittels einer Blende selektiert (Durchmesser von 8 mm) und über ein Teleskopsystem parallelisiert. Die Anregung der Probe erfolgt 90° zum Abtaststrahlengang. Es werden Anregungsenergien im Bereich von ca. 4 mJ erzielt.

### Abtastlicht und Detektion

Als Messlichtquelle diente eine Xenon-Lampe (LC-08, Hamamatsu), die einen Wellenlängenbereich von 390 nm bis 800 nm abdeckt. Ein Monochromator mit einer Auflösung von ca. 3 nm selektierte vor der Probe die Messwellenlänge. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig Messlicht auf die Probe fällt, um aktinische Effekte zu vermeiden. Der zweite Monochromator nach der Probe diente der Abtrennung von Streulicht. Die Detektion erfolgte über einen Photomultiplier (Photosensor H6780-02, Hamamatsu). Die Triggerung der Messungen erfolgte durch Streulichtanteile des Anregungspulses. Das Signal wurde über ein digitales Speicheroszilloskop mit einem einstellbaren Datenpunktabstand aufgezeichnet.

## 4.2 Datenevaluation

Da die Daten in einem sehr großen Zeitbereich mit linearem Punkt-zu-Punkt-Abstand aufgenommen wurden, mussten sie nachbehandelt werden. Hierzu wurde ein in der Programmiersprache LabVIEW geschriebenes Datenreduktionsprogramm verwendet.

Dieses Programm bietet die Möglichkeit die Daten im kürzesten Zeitbereich mit der im Oszilloskop ausgewählten Zeitauflösung zu belassen und generiert mit einer auswählbaren Anzahl an Schritten einen exponentiell ansteigenden Datenpunktabstand ab einem späteren Zeitpunkt.

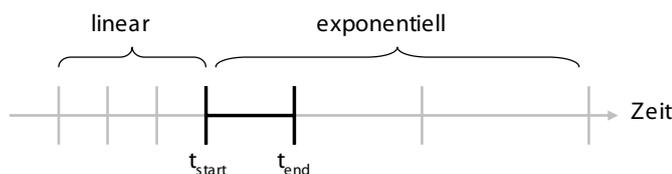


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Datenreduktion

Die Intensitäten werden hierbei zwischen den vom Programm berechneten exponentiellen Zeitpunkten nach folgender Formel gemittelt.

$$I(\bar{t}) = \frac{\sum_{i=t_{\text{start}}}^{t_{\text{end}}} I_i}{n_{t_{\text{end}}} - n_{t_{\text{start}}}} \quad (4.1)$$

Der gemittelte Intensitätswert wird  $\bar{t}$  zugeordnet.

$$\bar{t} = \frac{t_{end} - t_{start}}{2} \quad (4.2)$$

Abschließend berechnet das Programm aus den nun reduzierten Intensitätswerten mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz die Absorptionsänderungen.

$$\Delta A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (4.3)$$

Für den Wert  $I_0$  werden die vor dem Zeitnullpunkt gemessenen Intensitätswerte gemittelt.

### 4.3 Temperaturabhängige Messungen

Schon Ende des 19. Jahrhunderts fanden Van't Hoff [124] und Arrhenius [125] durch die Analyse von chemischen Reaktionen heraus, dass es in einem begrenzten Temperaturbereich einen Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit  $k$  und der Temperatur  $T$  gibt. Die Erhöhung der Temperatur hatte eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge.

$$\ln k = \frac{-E_a}{RT} + H \quad (4.4)$$

$R$  entspricht hier der universellen Gaskonstante und  $E_a$  der Aktivierungsenergie, d.h. die Energie, die ein Teilchen benötigt um reagieren zu können. Die Aktivierungsenergie wurde im gewählten Ansatz als temperaturunabhängig angesehen. Ebenfalls als temperaturunabhängig wird der sogenannte Häufigkeitsfaktor  $H$  betrachtet. Der Letztgenannte wird aber bei hohen Temperaturen signifikant temperaturabhängig, sodass die Arrhenius-Gleichung hier nicht mehr gilt. Gültigkeit hat die Arrheniusgleichung formal nur für Gasreaktionen.

Eine erweiterte Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Temperatur und Reaktionsgeschwindigkeit bietet die Eyring-Gleichung [126], die auch auf Reaktionen in Lösung angewandt werden kann. Formal beruht diese Gleichung auf der Theorie des Übergangszustand, die besagt, dass eine Reaktion über eine Zwischenstufe, den sogenannten Übergangszustand, bzw. aktivierten Komplex, verläuft. Am Beispiel einer bimolekularen Reaktion bedeutet dies:



Die Edukte  $A$  und  $B$  sind vom Produkt  $P$  durch eine Energiebarriere getrennt, deren Maximum als Übergangszustand  $\ddot{U}Z^\ddagger$  bezeichnet wird. Der Übergangszustand stellt eine instabile molekulare Anordnung dar, in der Bindungen gelöst und gebildet werden, d.h., es besteht ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen aktiviertem Komplex und den Reaktanden. Wenn die Energiebarriere durch das Vorhandensein von

ausreichend Aktivierungsenthalpie überwunden werden kann, wird das Produkt gebildet. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist proportional zur Konzentration des aktivierten Komplexes. Für die zeitliche Änderung der Konzentration des Übergangszustands gilt:

$$\frac{d[\ddot{U}Z^\ddagger]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[\ddot{U}Z^\ddagger] - k_2[\ddot{U}Z^\ddagger] \quad (4.6)$$

Da sich die Komponenten  $k_1[A][B]$  und  $-k_{-1}[\ddot{U}Z^\ddagger]$  aufheben ist die Bildung des Produktes durch folgende Gleichung gegeben.

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[\ddot{U}Z^\ddagger]}{dt} = k_2[\ddot{U}Z^\ddagger] \quad (4.7)$$

$k_2$  ist über die statistische Thermodynamik definiert. Dabei wird angenommen, dass der Übergangszustand eine Lebensdauer  $\tau$  von einer Schwingungsperiode hat. Die Lebensdauer des aktivierten Komplexes ist gerade die Zeit, die von den sich nähernden Edukten gebraucht wird, um die Strecke  $\lambda$  des Energieprofils mit einer Geschwindigkeit  $v$  zu durchdringen (De Broglie-Beziehung):

$$\tau = \frac{\lambda}{v} = \frac{h}{m \cdot v^2} \quad (4.8)$$

Nur die Bewegung in Richtung der Reaktionskoordinate (Translation) führt zur Produktbildung. Da die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  durch  $k_2 = \frac{1}{\tau}$  und die Translationsenergie entlang einer Koordinate durch  $\frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}k_B T$  gegeben ist, erhält man

$$k_2 = \frac{k_B \cdot T}{h}, \quad (4.9)$$

wobei  $k_B$  die Boltzmann-Konstante ist,  $T$  die Temperatur in Kelvin und  $h$  die Planck-Konstante. Unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetz  $[\ddot{U}Z^\ddagger] = K^\ddagger \cdot [A] \cdot [B]$  erhält man für Gleichung 4.7

$$-\frac{d[\ddot{U}Z^\ddagger]}{dt} = \frac{k_B \cdot T}{h} K^\ddagger \cdot [A] \cdot [B] \quad (4.10)$$

Für die Gesamtreaktion ergibt sich somit eine Geschwindigkeitskonstante von

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} K^\ddagger \quad (4.11)$$

Mit der van't Hoffschen Gleichung für die Gleichgewichtskonstante  $K$

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (4.12)$$

erhält man die Eyring-Gleichung in der Form:

$$\begin{aligned}k &= \frac{k_B \cdot T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \\ &= \frac{k_B \cdot T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger + T \Delta S^\ddagger}{RT}\right)\end{aligned}\quad (4.13)$$

Durch die Umformung in

$$\begin{aligned}\ln k &= \ln\left(\frac{k_B \cdot T}{h}\right) - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \\ \ln \frac{k}{T} &= \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\end{aligned}\quad (4.14)$$

wird deutlich, dass man durch die Auftragung von  $\ln \frac{k}{T}$  gegen  $\frac{1}{T}$  aus der Steigung direkt die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\ddagger$  erhält. Die zugehörige Aktivierungsentropie  $\Delta S^\ddagger$  lässt sich über den Achsenabschnitt  $\frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right)$  berechnen.



## 5 Tieftemperatur-Experimente

*Die reinste Form des Wahnsinns ist es,  
alles beim Alten zu lassen und gleich-  
zeitig zu hoffen, dass sich etwas ändert.*

*Albert Einstein*

Neben der Möglichkeit sehr schnelle Dynamiken in Echtzeit mit den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen zeitaufgelösten Methoden zu beobachten, kann man alternativ Reaktionen über eine Reaktionsführung bei tiefen Temperaturen so verlangsamen, dass sie nun auf einer Zeitskala von wenigen Millisekunden bis hin zu mehreren Sekunden ablaufen. Der Zusammenhang zwischen der die Dynamik beschreibenden Geschwindigkeitskonstante  $k$  und der Temperatur  $T$  ist hierbei beispielsweise über die von Savante Arrhenius empirisch hergeleitete Gleichung

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{k \cdot T}} \quad (5.1)$$

gegeben. Hierbei ist  $E_A$  die Aktivierungsenergie,  $R$  die universelle Gaskonstante und  $A$  der präexponentielle Faktor oder auch Frequenzfaktor.

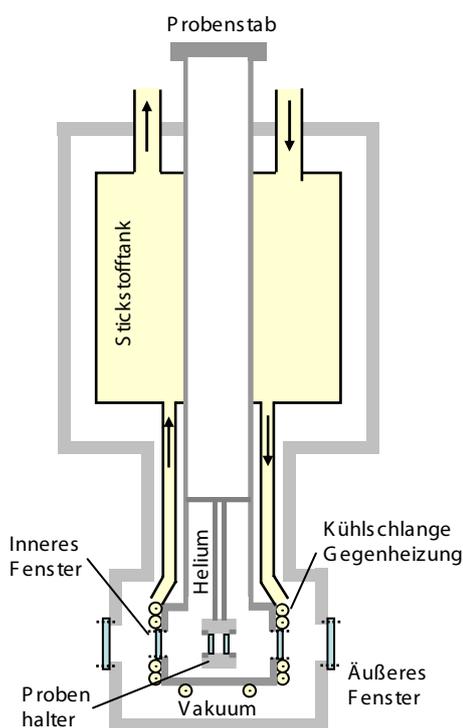
Aufgrund von Eisbildung bei Temperaturen  $\leq 0^\circ\text{C}$ , können die zu untersuchenden Proteinproben bei tieferen Temperaturen nicht in ihrer natürlichen Umgebung, der flüssigen, meist wässrigen Phase beobachtet werden. Für das Umgehen dieser Problematik sind zwei Möglichkeiten etabliert. Einerseits kann das Protein in einem Glycerol-haltigen Puffer gemessen werden. Diese hochviskose Mischung bildet beim Tieffrieren einen glasartigen Zustand. Der Glasübergang wird in der Literatur mehr oder weniger willkürlich als derjenige Punkt in der Druck-Temperatur-Ebene definiert, an dem die Viskosität der Flüssigkeit den Wert  $10^{12}$  Pa s annimmt. Zum Vergleich: Wasser hat unter Normalbedingungen eine Viskosität von etwa 1 mPa s, nicht-kristalliner Honig von typischerweise 1 Pa s.

Eine alternative Probenhandhabung bei tiefen Temperaturen ist die Herstellung von Proteinfilmen. Hierfür muss das Protein in Lipiden/Vesikeln rekonstituiert sein. Eine hochkonzentrierte Menge einer solchen Protein-Lipid-Mischung wird auf ein Haltematerial, das im zu beobachtenden Spektralbereich transparent sein sollte, aufgebracht. Durch die geschickte Wahl der Auftragungs- und Trocknungsmethode können geordnete wie auch ungeordnete Proteinfilme mit unterschiedlichen Hydratisierungsverhältnissen hergestellt werden [127–130]. Die Natur der Probenpräparation sowie die experimentell gewählten tiefen Temperaturen führen auch dazu, dass die Barrieren der beobachteten Prozesse häufig nicht die gleichen sind, wie unter den für die kinetischen Messungen benutzten Normalbedingungen. Gerade große Proteinbewegungen können beispielsweise

sowohl durch die Temperatur als auch durch teils kristallähnliche dichte Anordnung eingeschränkt sein.

## 5.1 Cryo-Trapping-Experimente im sichtbaren Spektralbereich

Für die Tieftemperaturexperimente im sichtbaren Spektralbereich wurde ein selbstgebauter Kryostat eingesetzt, der in Abbildung 5.2 skizziert ist.



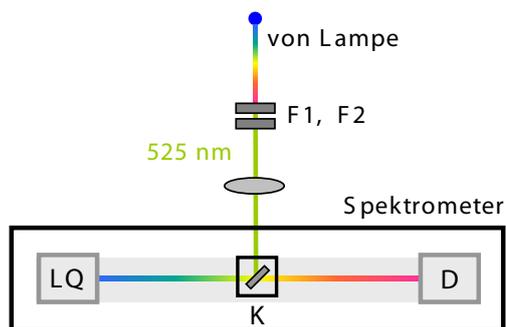
**Abbildung 5.1:** Schematischer Aufbau des Eigenbau-Kryostaten.

Um die Probe bei tiefen Temperaturen vor Kondensation von Wasser zu schützen wird die Probenkammer mit Heliumgas gespült. Der beschriebene Kryostat wurde auf dem Probenschlitten eines UV-vis Spektrometers (Specord S100, Analytik Jena) befestigt. Differenzspektren ( $\text{Probe}_{\text{belichtet}} - \text{Probe}_{\text{unbelichtet}}$ ) konnten in einem Bereich von 180 nm bis 850 nm aufgenommen werden.

### Durchführung der Messung und Auswertung der Daten

Zur Messung von Retinalproteinen wurde ein Proteinfilm hergestellt. Hierfür wurde ein zentrifugiertes Proteinpellet, das aus ca. 50  $\mu\text{g}$  Protein bestand, auf eine  $\text{CaF}_2$ -

Neben den eingezeichneten Fenstern standen zur Spektroskopie zwei weitere senkrecht zum dargestellten Querschnitt zur Verfügung. Da der Kryostat nicht nur für die Spektroskopie im UV-vis-, sondern auch im Infrarotbereich ausgelegt ist, wurde für die inneren und äußeren Fenster 2 mm dickes  $\text{CaF}_2$ -Substrat benutzt. Die Dichtigkeit der Fenster ist Grundvoraussetzung für eine problemlose Temperierung. Die äußeren Fenster konnten über herkömmliche Dichtungen vakuumdicht verschlossen werden, die inneren Fenster wurden über Indiumfolie verdichtet. Die Probe wurde in Form eines Proteinfilms, der zwischen zwei  $\text{CaF}_2$ -Scheiben fixiert war, über einen Probenstab im Kryostaten in einem  $45^\circ$  Winkel zum Abtastlicht positioniert. Zur Temperaturkontrolle enthält dieser einen Pt-100-Widerstandsdraht, der über ein Widerstandsmessgerät ausgelesen werden kann. Die Temperatur wird über den Strom an flüssigem Stickstoff und einer Gegenheizung geregelt. Hierdurch ist es möglich einen Temperaturbereich von etwa 150 K bis 240 K mit einer Genauigkeit von 2 K einzustellen.



**Abbildung 5.2:** Schematischer Aufbau des Tieftemperaturexperiments im sichtbaren Spektralbereich. F1 und F2 = Filter, K = Kryostat mit Probe, LQ = Lichtquellen des Spektrometers, D = Detektor

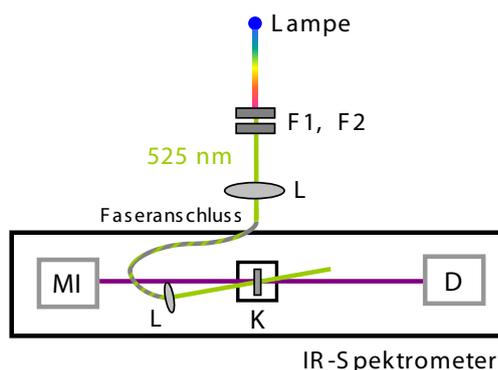
Scheibe (Durchmesser = 20 mm, Dicke = 2 mm) aufgetragen und unter Luftatmosphäre für einige Minuten angetrocknet. Ein ausreichend homogener Film wurde erhalten, in dem man eine zweite  $\text{CaF}_2$ -Scheibe aufpresste. Die erhaltenen Schichtdicken liegen in einem Bereich um  $5 \mu\text{m}$  -  $10 \mu\text{m}$ . Der Wassergehalt der Proben wurde im FTIR Spektrometer nachgeprüft. Die präparierten Filme weisen in der Regel reproduzierbare Wasser/Amid I- zu Amid II-Banden in einem Verhältnis 2:1 auf. Die Probe wurde über einen Probenstab im Kryostaten in einem  $45^\circ$  Winkel zum Abtastlicht positioniert.

Eine Messung wurde nach nachfolgend beschriebener Prozedur durchgeführt: Die Probe wurde ohne Messlicht auf ca. 150 K temperiert. Bei dieser Temperatur wurde ein Spektrum der unbelichteten Probe genommen, das als temperaturunabhängiges Referenzspektrum diente (Probe *unbelichtet*). Die Probe wurde nun für 60 s belichtet. Hierzu wurde eine Hg-Xe-Lampe (LC-4-02, Hamamatsu) in Kombination mit einer Filterkombination (Thorlabs, für PR: 500 nm Kurzpassfilter + 550 nm Langpassfilter) benutzt, deren Licht über eine Linse  $90^\circ$  zum Messlicht in den Kryostaten eingekoppelt wurde. Während der Aufwärmperiode wurden alle 3 bis 4 K Spektren (Probe *belichtet*) aufgenommen. Der Effekt des Messlichts auf die aufgenommenen Spektren ist aufgrund der geringen Intensität vernachlässigbar. Eine Temperaturrampe ohne Belichtung zeigte lediglich Signale im Bereich von  $< 1$  mOD.

Die erhaltenen temperaturabhängigen Spektren wurden über die Baseline-Funktion des Programmes Origin 7.5 streulichtkorrigiert. Von den Spektren, die nach Belichtung aufgenommen wurden (Probe *belichtet*), wurde das Dunkelspektrum (Probe *unbelichtet*) subtrahiert. Man erhält hierdurch temperaturabhängige Differenzspektren. Die Visualisierung wurde mit dem bereits beschriebenen MULTIVIEW-Programm des Pakets z20 realisiert (Siehe Seite 33).

## 5.2 Cryo-Trapping-Experimente im mittelinfraroten Spektralbereich

Um struktursensitive Informationen zu erhalten, sowie die für den Photozyklus von Retinalproteinen charakteristischen Protonierungsreaktionen einzelner Aminosäuregruppen beobachten zu können, wurden Tieftemperaturexperimente im mittelinfraroten Spektralbereich durchgeführt. Da Infrarotspektroskopie auf Temperaturschwankungen wesentlich sensitiver ist, wurden die Tieftemperaturexperimente mit einem kommerziell erhältlichen Stickstoff-Badkryostaten (Optistat DN, Firma Oxford Instruments) realisiert. Durch eine automatische Steuerung wird bei diesem Kryostaten das Verhältnis an Stickstoffstrom zu Gegenheizung so geregelt, dass in einem Bereich von 77 K bis 310 K eine Temperaturstabilität von  $\pm 0,1$  K erreicht wird. Zur Kontrolle der Temperatur besitzt der Optistat DN zwei Pt-100-Temperaturfühler, die an beiden Enden des Probenstabs angebracht sind. Um gute Temperaturübertragung zu gewährleisten, war die Probenkammer während der Messungen mit Heliumgas gefüllt. Die Probe wurde wie bereits für die sichtbaren Tieftemperaturmessungen beschrieben als Film auf eine  $\text{CaF}_2$ -Scheibe (Durchmesser = 12 mm, Dicke = 2 mm) aufgetragen.



**Abbildung 5.3:** Schematischer Aufbau des Tieftemperaturexperiments im infraroten Spektralbereich. D = Detektor, F1 und F2 = Filter, K = Kryostat mit Probe, L = Linse, MI = Michelson-Interferometer

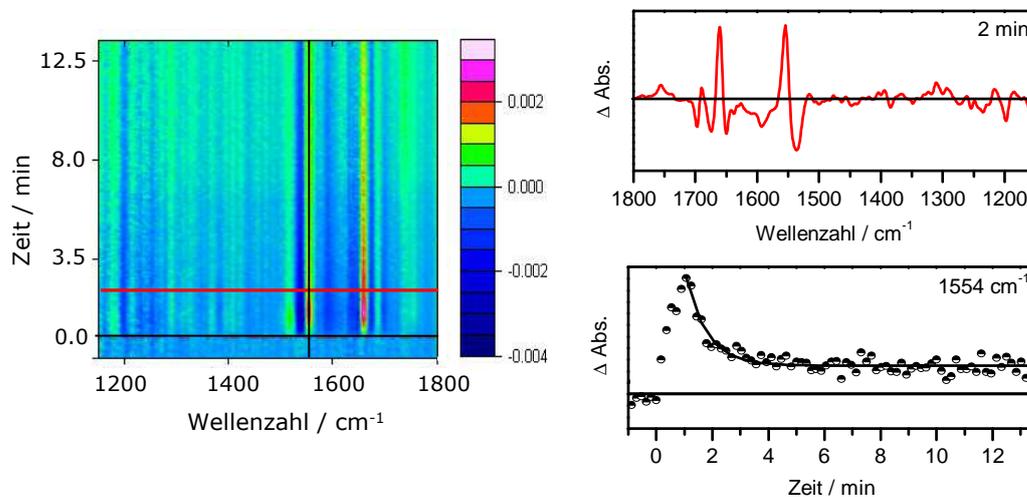
Da die Messungen über sichtbares Licht initiiert werden, musste der Kryostat auch für diese Experimente mit Fenstern aus  $\text{CaF}_2$ -Substrat bestückt sein. Dies stellte sich als problematisch heraus, da  $\text{CaF}_2$  nicht als (inneres) Fenstermaterial kommerzieller Systeme verwendet wird, da diese aufgrund hoher thermischer Spannungen häufig brechen. Das Design dieser Fenster und die Abdichtung wurde daher in dieser Arbeit entwickelt. Zur Abtastung der Reaktionsdynamik wurde ein Bruker IFS 66 FTIR-Spektrometer benutzt, von dem allerdings lediglich das Interferometer und die Elektronik übernommen wurden. Der Probenraum wurde kontinuierlich mit Trockenluft gespült, um der Absorption der Wasser- und  $\text{CO}_2$ -Banden entgegenzuwirken. Die Anregung wurde daher über eine Faser ins Spektrometer eingekoppelt. Als Anregungsquelle diente eine Xenonlampe (Hamamatsu, LC 8-04), die mit einer Filterkombination (Thorlabs, für PR: 500 nm

Kurzpassfilter + 550 nm Langpassfilter) bestückt war, um die geeignete Wellenlänge zu selektieren.

### Durchführung der Messung und Auswertung der Daten

Die Proteinfilmpräparation erfolgte auf eine der Prozedur der sichtbaren Tieftemperaturmessungen ähnliche Weise. 6 - 10  $\mu\text{L}$  einer hochkonzentrierten PR-Lösung wurden auf einem  $\text{CaF}_2$ -Fenster kreisförmig aufgetragen. Der Film wurde abgedeckt, ca. 30 min angetrocknet und anschließend durch Anhauchen befeuchtet. Der Hydratisierungsgrad und der pH-Wert wurden mit Hilfe von IR- und sichtbarer Spektroskopie kontrolliert.

Anders als bei den sichtbaren Trapping-Experimenten wurden die Messungen im infraroten Spektralbereich nur bei einer Temperatur durchgeführt. Eine Messung wurde gestartet, indem die Probe für 60 s belichtet wurde. Die Abtastung erfolgte üblicherweise zwischen  $2000\text{ cm}^{-1}$  und  $1000\text{ cm}^{-1}$  mit  $4\text{ cm}^{-1}$  Auflösung. Je nach Temperatur und Problemstellung wurden sowohl statische oder auch RapidScan-Experimente durchgeführt. Beispielsweise wurde bei 77 K auf Grund der fehlenden Proteinkinetik nur ein einzelnes Differenzspektrum mit 512 Mittlungen aufgenommen. Die RapidScan-Messungen wurden mit einer Spiegelgeschwindigkeit von 280 kHz durchgeführt. Bei einer Mittlung von etwa 200 Interferogrammen erhielt man eine durchschnittliche Auflösung von 150 ms. Die Datenakquisition erfolgte mit der Brukersoftware OPUS. Ein typischer Datensatz ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

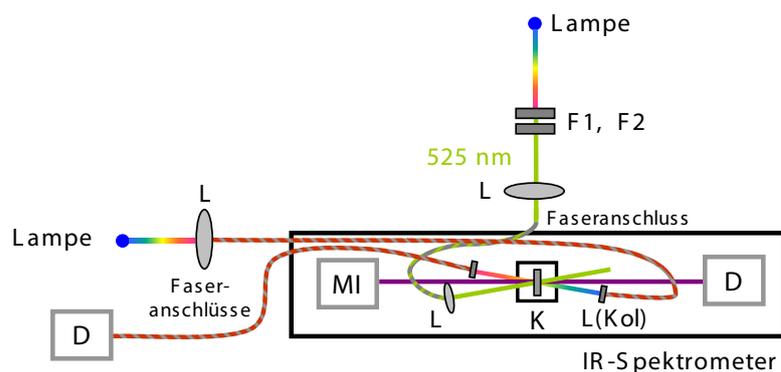


**Abbildung 5.4:** Darstellung eines RapidScan-Spektrums mit den darin enthaltenen transienten Spektren sowie transienten Absorptionsänderungen.

Die Daten wurden in Matlab und Origin weiterverarbeitet. Dies beinhaltet Basislinienkorrektur in Form einer Offsetkorrektur, Berechnung von transienten Absorptionsänderungen bei verschiedenen Wellenzahlen (grün) sowie Darstellung einzelner oder gemittelter transientser Spektren (schwarz).

### 5.3 Kombinierte IR/vis-Tieftemperaturexperimente

Da die Intermediatzuordnung bei Retinalproteinen im allgemeinen auf dem sichtbaren Absorptionsmaximum beruht und eine Bandenzuordnung für die untersuchten Proben im infraroten Spektralbereich nicht vorhanden war, wurde ein Tieftemperaturexperiment konstruiert, in dem die Antwort des Proteins und des Retinalchromophors simultan aufgenommen werden kann. Dieses basiert auf dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen IR-Experiment. Da der Platz in der Probenkammer des IR-Spektrometers begrenzt ist, wurde das sichtbare Spektrometer über Faseroptik integriert.



**Abbildung 5.5:** Schematischer Aufbau des kombinierten IR/vis-Tieftemperaturexperiments im infraroten Spektralbereich. D = Detektor, F1 und F2 = Filter, K = Kryostat mit Probe, L = Linse, L(Kol) = Kollimatoren, MI = Michelson-Interferometer

Als Lichtquelle diente hierbei eine Kombination aus Xenon- und Deuteriumlampe (DH-2000, Micropack Inc.), die über eine Linse in eine Quarzfaser (Kerndurchmesser 0,1 mm, Avantes) eingekoppelt und durch eine Optik kollimiert in einem Winkel von  $10^\circ$  zum IR-Strahl durch die Probe gelenkt wurde. Eine weitere Faser gleicher Bauart sammelte das Messlicht und leitete es in den Detektor (MCS 55 multichannel spectrometer module, Carl Zeiss). Die sichtbaren Spektren wurden in einem Spektralbereich von 380 - 650 nm mit einer Integrationszeit von 300 ms aufgenommen. Es wurden jeweils 10 Spektren gemittelt. Der leere Kryostat wurde als Referenz benutzt. Um Streueffekte zu korrigieren wurden den Rohspektren folgende Funktion

$$A + B \cdot \lambda^{-C} \quad (5.2)$$

abgezogen. Aus den korrigierten Absorptionsspektren wurden mit Hilfe des Programmpakets Origin 7.5 Differenzspektren ( $\text{Probe}_{\text{belichtet}} - \text{Probe}_{\text{unbelichtet}}$ ) gebildet.

# 6 Bakteriorhodopsin als Referenzsystem

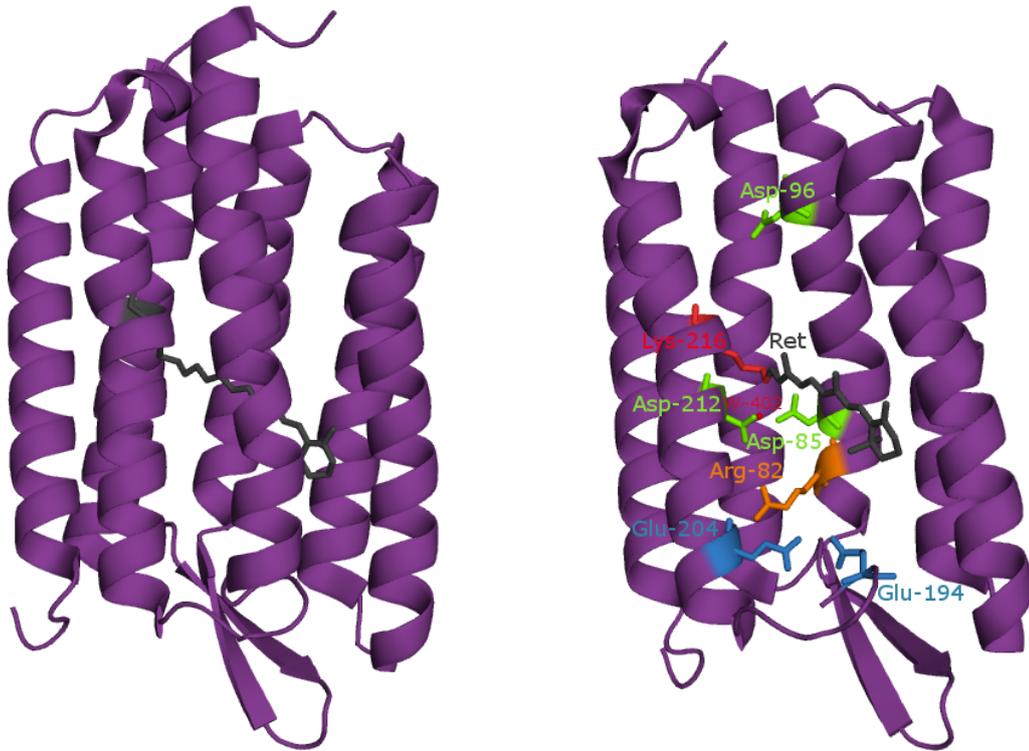
*Das Wichtigste ist es, nicht mit den  
Fragen aufzuhören.*

—————  
*Albert Einstein*

Bakteriorhodopsin (BR) ist ein 26 kDa großes Retinal-haltiges Transmembranprotein, das Anfang der 1970er Jahren in halophilen Archaeen entdeckt wurde [131, 132]. Als lichtgetriebene, auswärts-gerichtete Protonenpumpe konvertiert BR die Energie von grünem Licht in einen elektrochemischen Protonengradienten, der von der ATP-Synthase zur Erzeugung von ATP genutzt wird [16, 21, 133–135]. Dieses Zusammenspiel wird in der Literatur auch als halophile Photosynthese bezeichnet. Als Modellsystem für die chemiosmotische Kopplung sowie für Transportprozesse in Proteinen im Allgemeinen wurde BR in den letzten vier Dekaden umfangreich untersucht. Diesen Studien kam dabei die einfache Handhabung und hohe Stabilität des Proteins zu Gute. Da BR in allen nachfolgend diskutierten Studien als Referenzsystem benutzt wird, soll auf den folgenden Seiten kurz auf für den Protonentransport wesentliche strukturelle Eigenschaften eingegangen werden. Danach erfolgt die Beschreibung des Photozyklus, wobei aufgrund des Schwerpunkts dieser Arbeit der Fokus auf die Primärdynamik gelegt wurde. Die Informationen wurden im wesentlichen folgenden Review-Artikeln und den enthaltenen Referenzen entnommen [16, 21, 133].

## 6.1 Die Struktur

In der Zellwand ist BR in Form von Trimeren in eine hexagonale, zweidimensionale kristalline Struktur eingebettet [132, 136], die wegen ihrer Färbung Purpurmembran genannt wird. Kryo-Elektronenmikroskopie an zweidimensionalen BR-Kristallen machte deutlich, dass das Protein aus sieben Transmembran-Helices (als A-G bezeichnet) aufgebaut ist, die über kurze Loops verbunden sind. In der Mitte der geformten Struktur ist der Chromophor über eine Schiffbase kovalent an einen Lysinrest (Lys-216) der Helix G gebunden [137], der das Protein in einen cytoplasmatischen und extrazellulären Halbkanal aufspaltet. Die Entwicklung der Kristallisation in kubischen Lipidphasen ermöglichte die Anzucht von hochwertigen dreidimensionalen BR-Kristallen [138]. Die Auflösung der Röntgenstruktur verbesserte sich dabei mit den Jahren von 2,30 Å [139] über 1,90 Å [140] auf 1,55 Å [34]. Die Kristallstruktur zeigte, dass die protonierte Schiffbase, von der der Protonenpumpprozess ausgeht, sowie das als primärer Protonenakzeptor fungierende Asp-85 durch ein Wassermolekül (W-402) getrennt sind. Der extrazelluläre Halbkanal weist daneben sieben weitere Wassermoleküle auf, die zusammen mit den



**Abbildung 6.1:** Kristallstruktur von BR nach Lücke et al. [34] (pdb 1C3W). Links ist das Peptidrückgrat in der Cartoon-Darstellung gezeigt. Die Schiffbasenverknüpfung von Retinal und Lys-216 ist in grau eingezeichnet. In der rechten Darstellung der Struktur sind die Seitenketten der wichtigsten am Pumpvorgang beteiligten Aminosäure zusätzlich farblich gekennzeichnet. Zur besseren Darstellungen ist die Helix F von Ser-163 bis Ser-193 nicht gezeigt.

polaren Aminosäureseitenketten von Asp-85, Asp-212, Thr-89, Trp-86, Tyr-83, Tyr-57, Tyr-185, Arg-82, Glu-194 und Ser-193 ein dreidimensionales Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk bilden, das von der Schiffbase bis zur Proteinoberfläche reicht. Eine Vielzahl an Studien beweisen, dass diese Aminosäuren alle am Protonenfreilassungsprozess beteiligt sind. Im Gegensatz hierzu weist die Grundzustandskristallstruktur kein Wassercluster im cytoplasmatischen Halbkanal auf. Dies ist erstaunlich, da durch den Transfer des Protons vom primären Protonendonator Asp-96 zur Schiffbase ein hydrophober Bereich von 10-12 Å überwunden werden muss. Das für den Protonentransfer durch diesen Proteinteil benötigte Wasserstoffbrückenetzwerk muss daher transient gebildet werden.

Als weitere Besonderheit stellten die Strukturen heraus, dass vier der sieben Helices Unregelmäßigkeiten, bzw. Schleifen (sogenannte Kinks) aufweisen. Die Diskontinuitäten in den Helices B, C und F sind auf Proline zurückzuführen, wohingegen das Abknicken in Helix G beim Retinal-verknüpfenden Lys-216 Wasserstoffverbrückungen der Rückgrat-Carbonylgruppen zugeschrieben werden muss. Dieses bis dato nicht bekannte Strukturmotiv wurde  $\pi$ -Bulge genannt [34]. Die Grundzustandskristallstrukturen geben wie gezeigt

bereits Hinweise darauf über welche Aminosäureseitenketten das durch die Anregung des Retinals getriggerte Pumpen von Protonen abläuft. Für den wirklichen Ablauf sind aber dynamische Messungen unabdingbar. Auch die Strukturen der Reaktionsintermediate sind von eminenter Bedeutung. Diese konnten in den letzten Jahren mit Hilfe spezifischer Belichtung bei tiefen Temperaturen sowie durch Mutationen erhalten werden [141–148]. Eine Übersicht über diese Strukturen bietet nachfolgende Referenz [149].

## 6.2 Der Photozyklus

Nach Anregung durchläuft BR mehrere, verschieden stabile Intermediate, bevor es nach etwa 30 ms wieder den Grundzustand erreicht. Diese als Photozyklus bezeichnete Abfolge von Reaktionen wurde durch unterschiedlichste biophysikalische Methoden untersucht. Die konformationellen Änderungen des Chromophors sowie des Proteins haben signifikante Verschiebungen des sichtbaren Absorptionsmaximums zur Folge. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima sind dabei kennzeichnend für das jeweilige Photointermediat. Diese werden mit den dem Alphabet folgenden Buchstaben (H, I<sub>460</sub>, J<sub>600</sub>) K<sub>590</sub>, L<sub>550</sub>, M<sub>410</sub>, N<sub>530</sub> und O<sub>640</sub> bezeichnet [150], was für viele anderen Retinalproteine übernommen wurde. Dem Photozyklus vorgeschaltet ist die sogenannte Lichtadaption. Hierbei verschiebt sich das in Dunkelheit vorliegende Verhältnis an all-*trans*-15-*anti*- und 13-*cis*-15-*syn*-Retinal von 1:1 [151, 152] fast vollständig auf die all-*trans*-Konfiguration [151, 153].

### Die Retinalisomerisierung

Die photoinduzierte Reaktion, die die Bildung des ersten Grundzustandsintermediats K beschreibt, wird als Primärreaktion bezeichnet. In ihr findet vornehmlich die Retinalisomerisierung statt, die eine pH-unabhängige Quantenausbeute von 0,65 aufweist [154–157]. Schwingungsspektroskopie [155, 158, 159] und Kristallstrukturanalysen [141, 142] konnten zeigen, dass der Chromophor hiernach in der 13-*cis*-15-*anti*-Konfiguration vorliegt. Die Kristallstrukturen lassen je nach Präparation des K-Zustands unterschiedliche strukturelle Auswirkungen auf die Aminosäureseitenketten der Retinalbindetasche sowie die umgebenden Wassercluster erkennen. Klar ist aber, dass dieser Zustand hochenergetisch ist, da er die nachfolgenden Reaktionen antreibt.

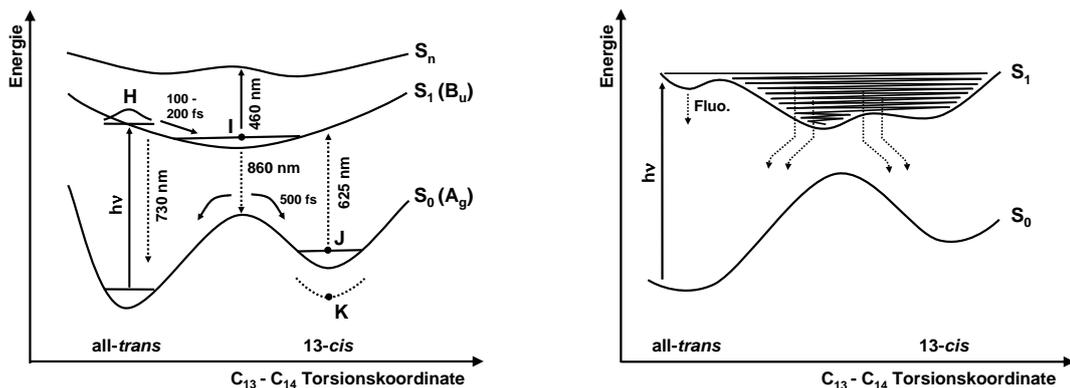
Schon frühe Experimente mit Pikosekunden-Zeitauflösung machten klar, dass die Isomerisierung auf einer sub-Pikosekunden-Zeitskala abläuft [160–164]. Transiente Absorptionmessungen im sichtbaren Spektralbereich mit Femtosekunden-Zeitauflösung konnten Mitte der 1980er Jahre dann zeigen, dass die Dynamik mit einer schnellen Bewegung aus dem Franck-Condon-Bereich (100 fs - 200 fs) beginnt, auf die die Deaktivierung des angeregten Zustands mit 500 fs folgt [165, 166]. Ein Relaxationsprozess auch als J → K Übergang bezeichnet schließt die Primärdynamik ab. Dieses Ergebnis wurde im folgenden durch weitere transiente Absorptionmessungen sowie Resonanz Raman-Experimente validiert [167–169]. Demgegenüber beobachteten Gai et al. [170] einen biphasischen Zerfall des angeregten Zustands, bei dem die eine Komponente (0,2 ps) der

Produktbildung zugeschrieben wurden, die andere (0,75 ps) jedoch nicht produktbildend sein soll. Ähnliche Zeitkonstanten wurden auch in zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen gefunden. Sie wurden dort aber nicht als verzweigte  $S_1$ -Deaktivierungspfade diskutiert [171–173]. Die in allen Messungen beobachtete kurze Lebensdauer des angeregten Zustands von einigen wenigen hundert Femtosekunden steht im Einklang mit der sehr geringen Fluoreszenzquantenausbeute von  $1,3 \times 10^{-4}$  [174, 175].

Zur Interpretation der beobachteten Reaktion aus dem Franck-Condon-Bereich (H-Zustand) über die schwingungsrelaxierte Population im angeregten Zustand (I-Spezies) zum isomerisierten (schwingungs-)heißem Chromophor (J-Zustand) und dem vollständig relaxierten K-Intermediat wurden mehrere Modelle aufgestellt. Hierbei war die primäre Frage über welche Reaktionskoordinaten die Isomerisierung verläuft. Belege für die einzelnen Modelle konnten über zeitaufgelöste Schwingungsspektroskopie erlangt werden, da hierdurch gezielt die einzelnen Moden beobachtet werden.

### Die Zwei-Zustands-Ein-Moden-Modelle

Die einfachsten Modelle gehen vom Grundzustand ( $A_g$ ) und dem ersten angeregten Zustand ( $B_u$ ) aus. Man bezeichnet diese Modelle daher auch als Zwei-Zustands-Modelle. Sie werden in der Behandlung der Dynamik des ersten angeregten Zustands sowie der Anzahl der Reaktionskoordinaten unterschieden. Das einfachste Modell ist dementsprechend ein Ein-Moden-Modell eines Zwei-Zustands-Systems, bei dem die Isomerisierung rein über die Torsion um die  $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung beschrieben wird. Man unterscheidet hierbei inertielle und überdämpfte Modelle. In der inertialen Beschreibung der Retinalisomerisierung zerfällt der elektronisch angeregte Zustand schnell gegenüber der Schwingungsrelaxation [176]. Bei den überdämpften Modellen wird das Schwingungsgleichgewicht im angeregten Zustand hingegen (in unterschiedlichem Ausmaß) vor dem Übergang in den Grundzustand erreicht [165, 168, 177].



**Abbildung 6.2:** In der Literatur vorgeschlagene Zwei-Zustands-Ein-Moden-Modell der Primärreaktion von BR. Links ist der gedämpfter Fall gezeigt, das rechte Modell beschreibt den inertialen Fall. Die Modelle sind den Abbildungen in den Referenzen [168] und [176] nachempfunden.

Die reaktive Potentialfläche des angeregten Zustands führt das angeregte all-*trans*-Retinal barrierelos zum 13-*cis*-Photoprodukt. Die 100–200 fs Dynamik repräsentiert in diesem Fall die gedämpfte Torsionsbewegung aus der Franck-Condon-Region, die von Schwingungsdephasierung und Relaxation entlang der barrierelosen Torsionskoordinate begleitet wird. Schon um das Jahr 1990 konnte durch Resonanz Raman-Messungen eindeutig gezeigt werden, dass die Isomerisierung und damit die Bewegung auf der Torsionskoordinate im sub-Pikosekunden-Bereich abläuft [167, 178, 179]. Die mit der Zeit immer weiter verbesserte Zeitauflösung von Raman- und IR-Experimenten erlaubt es mittlerweile für die Bildung der charakteristischen 13-*cis*-C-C-Schwingung um  $1190\text{ cm}^{-1}$  eine Zeitkonstante von 500 fs anzugeben [169, 180, 181]. Es ist hingegen zu bezweifeln, dass das Wellenpaket aus dem Franck-Condon-Bereich direkt über die Torsionsmode relaxiert.

### ***Die Zwei-Zustands-Zwei-Moden-Modelle***

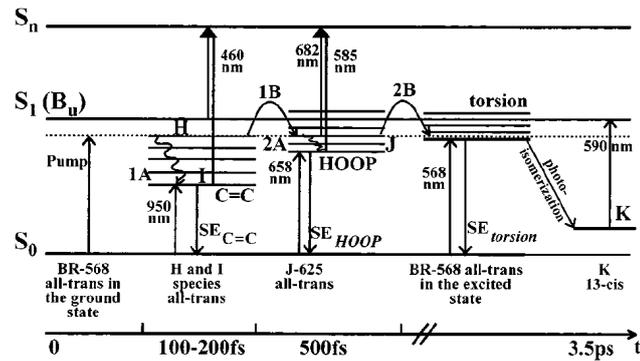
Eine vergleichende Studie der Dynamik des angeregten Zustands an BR mit natürlichem all-*trans*-Retinal, sowie einem künstlichen Retinal-Chromophor, bei dem die Isomerisierung über ein Ringsysteme blockiert ist, stellte heraus, dass beide Systeme den gleichen zeitlichen Anstieg sowie eine identische spektrale Charakteristik im Bereich der Absorption des angeregten Zustands und der stimulierten Emission aufweisen [182–184]. Die Torsionsbewegung konnte somit als primäre Koordinate ausgeschlossen werden, sodass die schnelle Bewegung aus der Franck-Condon-Region einem anderen Freiheitsgrad zugeschrieben werden musste. Die beobachtete schnelle Blauverschiebung der C=C-Streckschwingung in Raman-Messungen befürwortete eine Interpretation in Richtung einer Streckbewegung des Retinal-Gerüsts [185].

Dieser Befund wurde in den Zwei-Zustands-Zwei-Moden-Modelle berücksichtigt, in denen die Isomerisierung neben der Torsionsmode zusätzlich über die hochfrequente C=C-Streckkoordinate [186–189] verläuft. Die Modelle beruhen auf *ab initio*-Rechnungen von Minimalretinalmodellen. Mit Hilfe dieser konnte gezeigt werden, dass das Wellenpaket nach Anregung den Franck-Condon-Bereich über die Relaxation der konjugierten Kohlenstoffkette in Richtung eines stationären Punktes verlässt. Die Isomerisierung findet anschließend auf dem angeregten Zustand entlang der Torsionskoordinate statt. Der Grundzustand wird über einen konischen Schnitt erreicht.

### ***Das Zwei-Zustands-Viel-Moden-Modell***

Die Multidimensionalität der Reaktionskoordinaten im angeregten Zustand wurde durch anti-Stokes Raman-Messungen (CARS, engl.: coherent anti-Stokes Raman spectroscopy) bewiesen, in denen gezeigt wurde, dass die Bildung des J-Intermediats neben der C=C-Streckschwingung noch über angekoppelte HOOP-Moden (engl.: hydrogen out of plane) verläuft [190–194]. Diesem Resultat nimmt sich das sogenannte Zwei-Zustands-Viel-Moden-Modell [195] an. Das Modell enthält neben der Torsions- und C=C-Streckkoordinate noch mehrere hochfrequente Moden, wie die HOOP-Mode. Auch

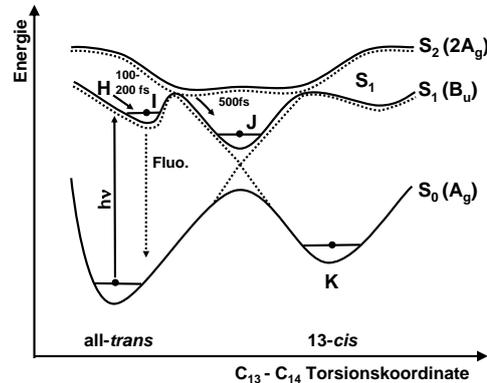
hier ist die C=C-Streckmode die primär angesprochene Schwingung. Die Überschussenergie wird im Verlauf der Reaktion sukzessive über intermolekulare Schwingungsrelaxation oder intramolekulare Energieabgabe an niederfrequente Moden weitergegeben. Die Isomerisierung ist durch die Kopplung der Torsion an den angeregten Zustand beschrieben. Der isomerisierte Zustand soll innerhalb von 3,5 ps erreicht werden.



**Abbildung 6.3:** Das Zwei-Zustands-Viel-Moden-Modell der Primärreaktion von BR. Die Graphik wurde Referenz [195] entnommen.

### Das Drei-Zustands-Modell

Neben den aufgezeigten Zwei-Zustands-Modellen werden in der Literatur zudem noch Drei-Zustands-Modelle diskutiert [196, 197]. Diese beziehen zusätzlich noch den zweiten angeregten Zustand ( $2A_g$ ) mit ein. Es kommt dabei zu einer starken nichtadiabatischen Wechselwirkung zwischen den ersten beiden angeregten Zuständen nahe der *all-trans*- und *13-cis*-Geometrie und einer schwachen Wechselwirkung zwischen dem ersten angeregten Zustand und dem Grundzustand nahe der  $90^\circ$ -Geometrie. Dies bedeutet, dass Barrieren entlang der Torsionskoordinate existieren. Die experimentell gefundene 100 - 200 fs Zeitkonstante wird auf die Bewegung aus dem Franck-Condon Bereich bezogen. Jedoch ist die primäre Mode die Torsion, was sich wie oben beschrieben als nicht richtig herausgestellt hat. Die aufgrund von Wechselwirkungen entstandene Barriere in der  $S_1$ -Potentialfläche wird in Richtung des konischen Schnitts innerhalb von ca. 0,5 ps überwunden. Man erreicht das J-Intermediat, welches nach diesem Modell dem angeregten Zustand zugeschrieben wird. Die Reaktion zum K-Intermediat findet innerhalb von 3 - 5 ps statt. Die beschriebene vermiedene Kreuzung zwischen den angeregten Zuständen konnte jedoch in theoretischen Rechnungen anderer Gruppen nicht validiert werden [177, 188]. Zur Zeit werden alle gezeigten Modelle in der Literatur kontrovers diskutiert. Auf Details kann an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Dies zeigt aber, dass die Primärreaktion von BR trotz der Vielzahl an theoretischen und experimentellen Ansätzen nicht komplett verstanden ist.

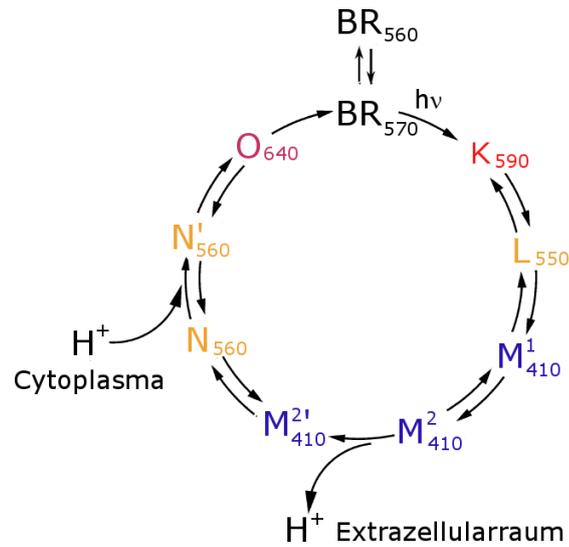


**Abbildung 6.4:** Das Drei-Zustands-Modell der Primärreaktion von BR. Die Graphik wurde den Abbildungen in den Referenzen [170, 198] nachempfunden.

### Die nachfolgenden langsamen Schritte des Photozyklus

Das nach der Isomerisierung bzw. dem K-Intermediat beobachtete L-Intermediat ist durch eine Verdrehung der  $C_{13}=C_{14}$  und der  $C_{15}=N$  Doppelbindungen gekennzeichnet. Die Schiffbase ist dabei immer noch über ein Wassermolekül (W402) mit dem primären Protonenakzeptor Asp-85 verbunden [143]. Die Kristallstruktur zeigt weiterhin anfängliche konformationelle Änderungen der H-verbrückten Seitenketten und Wassercluster. Die im FTIR-Spektrum beobachtete Störung einer Asp- oder Glu-Seitenkette ( $(-)$   $1740\text{ cm}^{-1}$ ) kann der Verschiebung der Position der Phenylringe von Phe-219 und Phe-42 zugeordnet werden [199, 200]. Es folgt der Übergang zum M-Intermediat, bei dem das Proton der Schiffbase an den primären Protonenakzeptor Asp-85 abgegeben wird. Diese Protonierung kann im Infrarotspektrum durch die Bildung einer positiven Bande bei  $1762\text{ cm}^{-1}$  visualisiert werden [201, 202]. Zudem wird die Freisetzung eines Protons in die extrazelluläre Oberfläche beobachtet. Dieses stammt entweder von einem Komplex aus Glu-194 und Glu-204 oder einem Wasser-Netzwerk in der unmittelbaren Nähe von Arg-82, Glu-194 und Glu-204 [201, 203]. Die Abgabe des Protons in die sogenannte Bulkphase ist bei pH-Werten  $> 5,8$  nach 1 ms erkennbar [204–206]. Rammelsberg et al. konnten zeigen, dass dies bei einem pH-Wert  $< 5,8$  erst beim späteren Zerfall des O-Intermediats passiert [201]. Die Deprotonierung der Schiffbase äußert sich im sichtbaren Absorptionsspektrum durch die Bildung eines blau-verschobenen Intermediats, das bei etwa  $410\text{ nm}$  absorbiert [207]. Aufgrund der spektralen Separation von den übrigen rot-verschobenen Intermediaten wird dies häufig als verlässlicher Indikator für das M-Intermediat benutzt. Kinetische Studien konnten zeigen, dass die mit der Deprotonierung der Schiffbase einhergehenden (De-)Protonierungsreaktionen saurer Aminosäureseitenketten und konformationellen Änderungen individuelle Kinetiken besitzen. Im Photozyklus von BR werden daher häufig zwei bis drei M-Intermediate ( $M^1$ ,  $M^2$  und  $M^{2'}$ ) dargestellt.

Da die Schiffbase durch den cytoplasmatischen Halbkanal reprotoniert wird, muss der BR-Photozyklus einen Schritt enthalten, bei dem die Zugänglichkeit des Proteins



**Abbildung 6.5:** Der Photozyklus von BR bei pH-Werten  $> 6$ . Die Intermediate sind mit Indizes versehen, die das Absorptionsmaximum des jeweiligen Zustandes angeben.

geändert wird. Die Identifikation dieses sogenannten Switch-Schrittes wurde in den letzten Jahren durch eine Vielzahl an Studien vorangetrieben. Dabei wurde diskutiert, ob sich (a) das Retinal durch die Deprotonierung von Asp-85 wegdreht [208], (b) sich lediglich der Stickstoff der Schiffbase umorientiert [209], (c) eine Bewegung von Helix C dazu führt, dass Asp-85 von der Schiffbase wegbewegt wird [210], (d) ein  $\text{OH}^-$ -Ion durch die Dissoziation eines Wassermoleküls (W-402) in den cytoplasmatischen Halbkanal übergeht und dort als Protonakzeptor fungiert [144] oder (e) der  $\text{pK}_a$  von Asp-85 nach der Protonenfreisetzung an der extrazellulären Oberfläche signifikant ansteigt, sodass Asp-96 der bessere Protonendonator ist [203, 211]. Die eindeutigsten experimentellen Belege gibt es für einen Zwei-Schritt-Prozess aus den Annahmen (b) und (e) [212, 213].

Die Reprotonierung der Schiffbase erfolgt im nachfolgenden Übergang zum N-Intermediat im Bereich von Millisekunden. Das Proton wird hierbei über Wassercluster vom Protonendonator Asp-96 übertragen [214–216]. Der Transfer des Protons erfordert dabei, dass der  $\text{pK}_a$  von Asp-96 von einem Wert von etwa 11 im Grundzustand auf ungefähr 8 erniedrigt wird [217, 218]. Der Einfluss des hydrostatischen und osmotischen Drucks auf diesen Reaktionsschritt zeigt, dass die benötigte Hydratisierung des cytoplasmatischen Halbkanals transient erfolgt [219, 220]. Der Transfer des Protons erfolgt wahrscheinlich über einen Grotthus-Mechanismus [221]. Die Verkippung der cytoplasmatischen Enden der Helices F und G sowie deren Auswirkungen auf die Schleife zwischen Helix E und F zeugen von den dramatischen Auswirkungen der Hydrophobizitätsänderungen auf die Struktur des Proteins [222–227]. Die Reprotonierung des primären Protonendonators Asp-96 findet im Übergang zum O-Intermediat statt [228]. Die sechs sauren Aminosäuren auf der cytoplasmatischen Oberfläche Asp-46, Asp-38, Asp-102, Asp-104, Glu-161 und Asp-166 dienen hierbei als eine Art Protonenfalle und sorgen dafür, dass diese ins

Protein gelangen [229–231]. Insbesondere Asp-38 wird hierbei eine entscheidende Rolle zugesprochen [232]. Die Reisoomerisierung des Retinals findet auf der gleichen Zeitskala wie die Reprotonierung von Asp-96 statt, sodass man annehmen kann, dass beide Prozesse gekoppelt sind. Man geht dabei davon aus, dass die Reprotonierung des Protonendonors die cytoplasmatische Orientierung der N-H-Bindung der Schiffbase destabilisiert und somit die Reisoomerisierung katalysiert [145]. Die deutlichen Schwingungsbanden im Bereich der HOOP-Mode des O-Intermediats zeigen, dass das gebildete *all-trans*-Retinal noch leicht verdreht vorliegt [233]. Diese Verdrillung entspannt sich bei der Rückbildung des ursprünglichen Grundzustands. Hierbei wird auch der primäre Protonenakzeptor Asp-85 wieder deprotoniert, sodass die ursprüngliche Ladungsverteilung um die Schiffbase wieder hergestellt ist. Die Beobachtung einer positiven Carboxylatschwingungsbande während der Lebensdauer des O-Intermediats wurde dahingehend interpretiert, dass diese Deprotonierung über Asp-212 abläuft [234, 235].

### **Beschreibung des Protonentransports über das Local-Access- und das IST-Modell**

In der Literatur haben sich zwei Modelle zur Beschreibung des Protonentransports durchgesetzt.

Das “Local-Access-Modell” [212, 213, 236] besagt, dass die lokale Geometrie des aktiven Zentrums im stabilen Ausgangszustand entweder zur extrazellulären oder zur cytoplasmatischen Seite des Proteins ausgerichtet ist. In den meta-stabilen Intermediaten fluktuiert sie hingegen zwischen beiden Seiten. Diese veränderliche Zugänglichkeit ermöglicht es somit den Donor- und Akzeptorgruppen während der Lebensdauer der Intermediate Protonen aufzunehmen bzw. abzugeben. Die systematische Änderung der  $pK_a$ -Werte dieser Gruppen durch Vorgänge wie Protonenfreisetzungen oder große Konformationsänderungen führt so zu unidirektionalem Protonentransport.

Im sogenannten “IST-Modell” [237, 238] wird der Photozyklus über eine Abfolge von drei Schritten beschrieben, nämlich der Isomerisierung (I), dem Schalten der Zugänglichkeit (engl.: Switch, S) und dem Transfer eines Protons (T). Das Modell basiert dabei auf zwei Annahmen. Erstens wird vorausgesetzt, dass der Isomerisierungszustand des Retinals die Zugänglichkeit der Schiffbase festlegt. Die *all-trans-15-anti*-Konfiguration führt beispielsweise dazu, dass das Schiffbasen-Proton in Richtung des extrazellulären Kanals zeigt. Die lichtaktivierte Isomerisierung induziert somit einerseits eine Änderung der Zugänglichkeit, andererseits auch einen Ionen-Transferprozess. Als zweite Annahme gilt, dass der Transfer- und der Switch-Prozess zwei voneinander unabhängige Prozesse sind. Die relativen Ratenkonstanten entscheiden, welcher Prozess zuerst abläuft, wodurch letztendlich auch die eindeutige Richtung des Transports festgelegt wird.



# 7 Der Photozyklus des bakteriellen Proteorhodopsins

*Es ist schwieriger eine vorgefasste Meinung zu zertrümmern als ein Atom.*

Albert Einstein

## 7.1 Einleitung

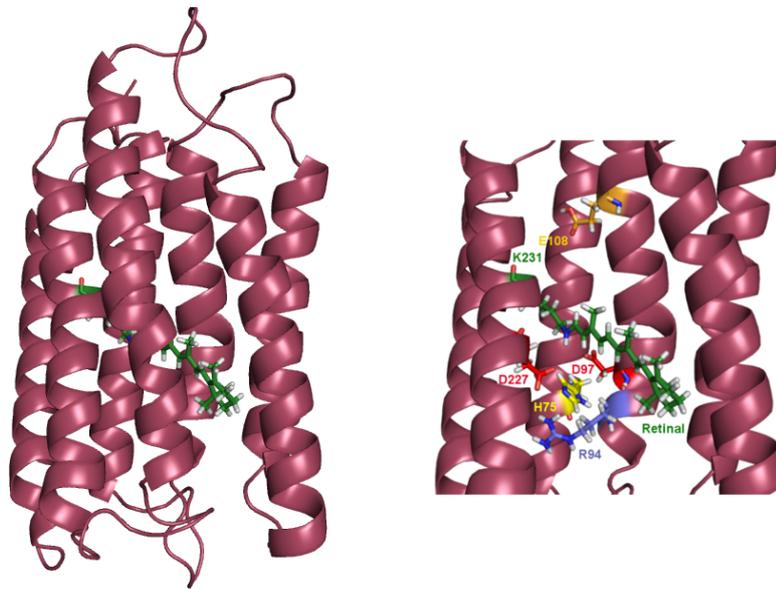
Im Jahre 2000 wurde in unkultiviertem  $\gamma$ -Proteobakterium aus der Monterey Bay das erste bakterielle Rhodopsin entdeckt. Als prokaryotisches Retinalprotein wurde dieser Stamm Proteorhodopsin (PR) genannt [27, 28]. Seit dieser Zeit wurden ca. 800 unterschiedliche PR-Varianten in diversen marinen Habitaten gefunden, deren Hauptfunktion das lichtgetriebene Pumpen von Protonen darstellt [29, 239, 240]. Es zeigte sich, dass die PR-Varianten in zwei Klassen unterteilt werden können: Die Mitglieder der einen Klasse kommen im oberen Bereich der euphotischen (lichtdurchfluteten) Zone des Meeres vor und werden aufgrund ihres Absorptionsmaximums grün absorbierende PRs (GPRs) genannt, während die am Rande der euphotischen Zone in etwa 75 m Tiefe gefundenen Mitglieder der zweiten Klasse aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften als blau absorbierende Proteorhodopsine (BPRs) bezeichnet werden. Die unterschiedlichen Absorptionscharakteristika wurden auf das in den verschiedenen Meerestiefen unterschiedliche Frequenzspektrum des Sonnenlichts zurückgeführt (natürliche Selektion). Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die beiden Klassen, obwohl sie eine Sequenzübereinstimmung von  $>78\%$  aufweisen [241], auch in ihren photochemischen Eigenschaften unterscheiden [28, 30, 241–245]. Die GPRs weisen einen schnelleren Photozyklus auf (GPR:  $\approx 30$  ms, BPR:  $\approx 200$  ms) und verfügen über eine wesentlich höhere Protonenpumpaktivität. Es wird daher diskutiert, ob BPRs eine eher regulatorische Rolle spielen als am Energiegewinnungsprozess beteiligt zu sein [245]. Unterstützt wird diese These durch Strukturmodellberechnungen, die besagen, dass die Tertiärstruktur von BPRs deutlich besser durch die Struktur eines sensorischen Retinalproteins (Sensorrhodopsin II (SRII)) beschrieben werden kann, während die Sequenz von GPRs eine höhere Übereinstimmung mit der Kristallstruktur der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) aufweist [246]. Interessanterweise zeigte sich, dass man durch die Substitution einer Aminosäureseitenkette (L105Q) das Absorptionsmaximum sowie die Photozykluscharakteristika von GPRs in die der BPRs überführen kann. Die umgekehrte Mutation von BPR (Q105L) führt zwar zu einem rot-verschobenen Absorptionsmaximum, die Beschleunigung des Photozyklus kann hiermit aber nicht erreicht werden [241, 245, 247]. Die weite Verbreitung verbunden mit den unterschiedlichen Funktionen

zeigt die Wichtigkeit dieser Proteine in der euphotischen Zone. Es ist zu vermuten, dass sie ein nicht zu vernachlässigender Faktor des phototrophen Energiegleichgewichts der Biosphäre sind. Bis heute sind daher eine Vielzahl an biologischen und spektroskopischen Untersuchungen an PRs durchgeführt worden. So wie die meisten Studien sind auch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente an GPR aus SAR-86  $\gamma$ -Proteobakterien gemacht worden. Die nachfolgenden Darstellungen beziehen sich daher alle auf diese Spezies, die der Einfachheit halber nun PR genannt wird.

Zur Klärung der Funktion eines Proteins sind strukturelle Informationen meist unabdingbar. Allerdings konnten für PR bis jetzt nur Einblicke in den strukturellen Aufbau über Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl. atomic force microscopy) sowie Elektronenmikroskopie (EM) gewonnen werden [248, 249], wohingegen die Struktur auf atomarer Ebene ungelöst bleibt. In jüngster Zeit kommen hierzu einige Festkörper-NMR-Studien, die über gezieltes Isotopenlabeling und 2D-Techniken Informationen über Wasserstoffbrückenbindungen in der Bindungstasche, die Protonierungszustände von Aminosäuren, Helix-Strukturen und Sekundärstrukturelemente lieferten [249–252]. Auch mittels FTIR-Differenzspektroskopie konnten Einblicke in die am Protonenpumpvorgang beteiligten Aminosäuren und deren Verknüpfung erlangt werden [30, 243, 253–260].

Um weitere Einblicke in die Struktur von PR zu bekommen, wurde die Aminosäuresequenz über das sogenannte Homologiemodelling einer bereits gelösten Kristallstruktur eines Rhodopsins angepasst, das eine hohe Sequenzhomologie zu PR aufweist. Hierfür kommen für PR sowohl die archaebakterielle Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) als auch das als Sensor fungierende Sensorrhodopsin II aus dem Organismus *Natronomonas pharaonis* (NpSRII) in Frage. Wie bereits oben erwähnt ist die Literatur einstimmig der Meinung, dass die Sequenz der GPRs gut an die Struktur von BR angepasst werden kann, wobei NpSRII das bessere Modell für BPRs darstellt [30, 241, 246, 261]. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren, die bei BR am Protonentransport beteiligt sind auch bei PR konserviert sind. Zu diesen Aminosäuren gehören neben der Schiffbasen-Bindung des Retinalchromophors über einen Lysinrest (BR: Lys-216, PR: Lys-231) der primäre Protonendonator (BR: Asp-96; PR: Glu-108) sowie die Protonenakzeptorgruppe (BR: Asp-85, Arg-82, Asp-212, PR: Asp-97, Arg-94, Asp-227). Die vorhergesagte Struktur sowie der Aufbau der Bindetasche sind in Abbildung 7.1 gezeigt.

Da man davon ausgehen kann, dass die molekularen Verknüpfungen der Seitenketten über direkte Wasserstoffbrücken und Wassercluster in PR deutlich verschieden von denen im BR sind, darf die aus dem Homologiemodell abgeleitete Struktur lediglich als Modellstruktur betrachtet werden. Abweichungen zeigten sich bereits auf dem Level der Oligomerisierung bzw. Aggregatbildung. Während die über AFM erzeugten Topographien für BR eine hexagonale Anordnung von Trimeren zeigten, wurden für rekonstituierte PR 2D-Kristalle hauptsächlich Hexamere und ein geringer Anteil Pentamere gefunden [248, 249, 262]. Weitere strukturelle Unterschiede konnten über spektroskopische Methoden erlangt werden. Die Gruppe von Kandori [256, 257] konnte beispielsweise zeigen, dass nach der Isomerisierung des Retinals für BR und PR deutlich unterschiedliche Blauverschiebungen der N-H- bzw. N-D-Streckschwingung der Schiffbase beobachtet werden. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass die Schiffbase in PR nach

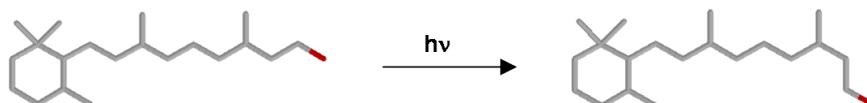


**Abbildung 7.1:** Links: Durch Homologiemodelling an BR (PDB-Datenbank: 1C3W) vorhergesagte Kristallstruktur von PR. Das Peptidrückgrat ist als Cartoon in pink dargestellt, der Retinalchromophor als Stäbchenmodell in grün. Rechts: Einblick in die Retinalbindetasche. Die wichtigen Aminosäuren wie der Protonenakzeptorkomplex bestehend aus Asp-97, Asp-227, His-75 und Arg-94, die Schiffbasenverknüpfung am Lys-231 sowie der Protonendonator Glu-108 sind farblich kodiert.

Isomerisierung weiterhin wasserstoffverbrückt ist, während diese Bindung im Falle von BR verloren geht. Über Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass diese Wasserstoffbrücke entweder zum Asp-227 selbst ausgebildet wird oder ein Wassermolekül diese Bindung vermittelt. Weiterhin ergab die pH-abhängige Verschiebung des sichtbaren Absorptionsmaximums eine geringe Erniedrigung des  $pK_a$ -Werts durch Mutation der Arg-94 Seitenkette [263], wohingegen in analogen Experimenten an BR eine Erhöhung des  $pK_a$ -Werts um etwa 5 Einheiten beobachtet wird [264–266]. Dies weist auf eine wesentlich schwächere elektrostatische Kopplung zwischen Arg-94 und Asp-97 in PR hin als dies für BR der Fall ist.

Der größte, mit hoher Wahrscheinlichkeit auf strukturelle Verschiedenheiten zurückzuführende Unterschied zwischen PR und BR liegt im  $pK_a$ -Wert des primären Protonenakzeptors. Dieser befindet sich für BR im sauren Bereich bei etwa pH 2 [133, 267], während für PR Werte zwischen 6,9 und 8,5 bestimmt wurden [30, 255, 268, 269]. Die Pufferbedingungen können dabei einen enormen Einfluss auf den  $pK_a$ -Wert haben [269, 270]. Es wird diskutiert, dass ein hochkonserviertes Histidin (His-75), das sich in der Mitte der transmembranen B-Helix befindet und eine direkte Wasserstoffbrücke zu Asp-97 haben soll, einen großen Beitrag zum deutlich erhöhten  $pK_a$ -Wert leistet [245, 251, 254, 261]. Ein homologes Histidin konnte in keinem archaealen Retinalprotein gefunden werden, ist jedoch im verwandten Xanthorhodopsin (XR) aus dem Eubakterium *Salinibacter ruber* enthalten. Die Kristallstruktur von XR zeigt den auch für PR angenommenen Asp-

His-Komplex [271]. Die Klärung der funktionellen Aufgabe von PRs in der photischen Zone wird durch die Tatsache erschwert, dass sich mit dem im Bereich des pH-Werts des Meerwassers liegenden  $pK_a$ -Wert von Asp-97 auch die Protonenpumprichtung umkehrt. Unter alkalischen Bedingungen wird wie für BR ein nach außen gerichteter Protonenfluss beobachtet [30, 31, 242]. Im Gegensatz hierzu ist nach innen gerichtetes Protonenpumpen bei sauren pH-Werten festgestellt worden [30, 31]. Diese funktionell beobachteten Unterschiede spiegeln sich auch in den Photozyklen bei alkalischen und sauren pH-Werten wider. Schon die Primärreaktion, in der die Isomerisierung des Retinalchromophors von der all-*trans* Konfiguration des Grundzustands [250, 268] in die 13-*cis* Konfiguration [253, 257] stattfindet, weist eine deutliche pH-Abhängigkeit auf.



**Abbildung 7.2:** Isomerisierungsreaktion in PR in der Stäbchendarstellung. Das im Grundzustand vorliegende all-*trans*-Retinal geht nach Belichtung bei etwa 525 nm in das 13-*cis*-Isomer über. Das Heteroatom Sauerstoff ist in rot eingefärbt. Wasserstoffatome sowie Mehrfachbindungen sind nicht gezeigt.

Huber et al. [272] und Lenz et al. [273] zeigten, dass die beobachtete Dynamik der K-Intermediatsbildung durch einen aufgespaltenen  $S_1$ -Deaktivierungspfad beschrieben werden kann. In Anlehnung an BR wurde folgendes Isomerisierungsmodell aufgestellt: Nach Anregung relaxiert die angeregte Population innerhalb von 150 fs aus dem Franck-Condon-Bereich. Diese Wellenpaketsbewegung ist hauptsächlich mit der Streckkoordinate der konjugierten Retinalkohlenstoffkette verknüpft. Es schließt sich eine Torsionsbewegung um die  $C_{13}$ - $C_{14}$  Bindung an, die die Population des angeregten Zustands zu einer konischen Durchschneidung mit dem Grundzustand führt. Nicht alle Moleküle erreichen diese hierbei direkt. Ein Teil landet in einem Minimum auf der angeregten Potentialhyperfläche, die durch eine Energiebarriere vom konischen Schnitt getrennt ist. Diese Teilpopulation gelangt daher erst nach ein paar Pikosekunden zur konischen Durchschneidung. Die festgestellten dynamischen Unterschiede zwischen der pH 9- und der pH 6-Probe wurden als Verkippung der  $S_1$ -Hyperfläche visualisiert, die zu unterschiedlichen Anteilen an Molekülen führt, die direkt oder über das weitere Minimum zur konischen Durchschneidung gelangen. Weiter Einblicke in die Prozesse nach Photoanregung lieferte ein bei pH 6 durchgeführtes Mehrpulsexperiment (Anreg- Abreg-Abtast-Spektroskopie, engl.: pump-dump-probe spectroscopy) [274]. Dieses konnte ein Intermediat im Grundzustands auflösen, das einer Fraktion nicht-isomerisierter Chromophore zugeordnet wurde. Gerade die Moleküle, die dem langsamen Isomerisierungskanal folgen sollen laut Rupenyan et al. [274] eine höhere Wahrscheinlichkeit haben diesen Zustand zu besetzen als den isomerisierten K-Zustand. Die Depopulationszeit zur stabilen Ausgangskonformation via Schwingungsrelaxation wurde mit 2 ps - 3 ps angegeben.

Wie die Isomerisierungsdynamik sind auch die nachfolgenden, thermisch getriebenen Schritte pH-abhängig. Unter alkalischen Bedingungen wurden in mehreren Blitzlicht-

photolyse- sowie StepScan- oder RapidScan-Experimenten [30, 255, 260, 275–277] vier Intermediate nachgewiesen, die in Analogie zu BR  $PR_L$ ,  $PR_M$ ,  $PR_N$  und  $PR_O$  genannt wurden. Die Übergangsraten variieren dabei abhängig von den Präparationsbedingungen wie Solubilisierung (Detergenzien), Rekonstitution (Art des Lipids), Wassergehalt in Filmen und dem genauen pH-Wert (8,5 bis 10). Übereinstimmend wurde jedoch berichtet, dass keine reinen Intermediate, sondern Gleichgewichte mehrerer Spezies beobachtet werden. Die Charakteristika des  $PR_M$ -Intermediats bilden sich dabei auf Zeitskalen von etwa  $10\ \mu\text{s}$  bis  $50\ \mu\text{s}$ . Die Gleichgewichte verlagern sich mit etwa  $0,5\ \text{ms}$  auf die späten Intermediate N und O. Die Dauer des kompletten Photozyklus wird in der Regel mit etwa  $40\ \text{ms}$  angegeben. Der Photozyklus bei sauren pH-Werten ist dadurch charakterisiert, dass zwar alle rotverschobenen Intermediate  $PR_L$ ,  $PR_N$  und  $PR_O$  deutliche Signale liefern, das M-Intermediat aber nicht beobachtet wird [30, 277, 278]. Auch der Abbau des K-Intermediats ist im Vergleich zu den alkalischen Proben mit etwa  $200\ \mu\text{s}$  deutlich länger, die Photozyklus-Turnover-Zeit ist jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit gleich ( $30\ \text{ms}$  bis  $40\ \text{ms}$ ). Für die hierzwischen liegenden Gleichgewichte sind unterschiedliche Übergangsraten beobachtet worden, was wahrscheinlich an der Verwendung unterschiedlicher Anpassungsmodelle liegt.

Da das M-Intermediat, das bei BR die Umkehr der Zugänglichkeit des Proteins ( $M_1 \rightarrow M_2$ ), den sogenannten Switch-Prozess, repräsentiert und auch ein Hauptmerkmal des von Friedrich et al. [30] vorgeschlagenen Pumpmechanismus ist, bei sauren pH-Werten kinetisch nicht beobachtet wurde und die Umkehr der Pumprichtung von Dioumaev et al. [242] an orientierten PR-Proben nicht nachvollzogen werden konnte, wurde der von Friedrich et al. [30] vorgeschlagene vektorielle Protonentransport in der letzten Dekade kontrovers diskutiert. Die vorliegende Arbeit nimmt sich unter anderem dieser Fragestellung mittels Tieftemperaturstudien des PR-Photozyklus an. Darüber hinaus werden die pH-Abhängigkeit der Primärdynamik mit Hilfe von ultraschneller Spektroskopie im sichtbaren und infraroten Spektralbereich sowie Mutationen in der Bindetasche weiter charakterisiert. Hierbei wird auch auf die Rolle des hochkonservierten Histidins genauer untersucht.

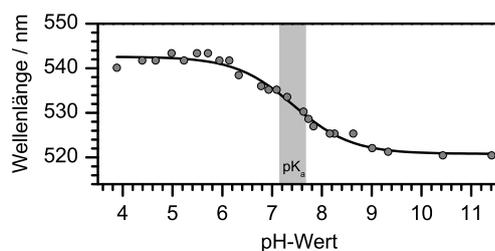
## 7.2 pH-abhängige Isomerisierung des Retinalchromophors

Um das bereits bestehende Isomerisierungsmodell des Retinalchromophors in PR zu erweitern, wurde die Primärreaktion pH-abhängig mittels transienter Absorption im infraroten Spektralbereich untersucht. Es wurde hierbei der Schwerpunkt auf den Bereich zwischen  $1490\ \text{cm}^{-1}$  und  $1690\ \text{cm}^{-1}$  gelegt, in dem die für den Retinalchromophor charakteristische C=C-Streckschwingung sowie die C=N-Streckschwingung der Schiffbasenverknüpfung beobachtet werden kann. Da in diesem Bereich aber starke Absorptionsbanden des Lösungsmittels ( $\text{H}_2\text{O}$ ) zu erwarten sind, wurden die Messungen in deuteriertem Wasser durchgeführt. Um einen möglichen Isotopeneffekt auf die  $S_1$ -Deaktivierungskinetik zu untersuchen wurden zudem transiente Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind in folgende Publikation mit eingeflossen:

Neumann, K., Verhoefen, M.-K., Weber, I., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Initial reaction dynamics of Proteorhodopsin observed by femtosecond infrared and visible spectroscopy*. *Biophys. J.* (2008), **94**: 4796-5907.

## Experimentelle Vorgehensweise

Für die Ultrakurzzeitmessungen wurden solubilisierte PR-Proben benutzt, welche die Arbeitsgruppe von Prof. C. Glaubitz, Universität Frankfurt, bereitstellte. Eine detaillierte Beschreibung der Proteinexprimierung und Aufreinigung findet sich in [279]. Die Proben wurden über Zentrifugalfiltrierung (Centriprep, 10 kD cut-off, Millipore) in die gewünschten Pufferbedingungen (20 mM TRIS, 100 mM NaCl) überführt. Der pH-Wert der Probe wurde so gewählt, dass der primäre Protonenakzeptor Asp-97 vollständig protoniert (pD 6,4) bzw. deprotoniert (pD 9,2) vorliegt (Abbildung 7.3). Die Konzentration der Probe wurde für die Anreg-Abtast-Experimente im sichtbaren Spektralbereich auf eine optische Dichte im Absorptionsmaximum von etwa 0,5 eingestellt, für die Experimente im infraroten Spektralbereich auf eine optische Dichte von 0,2 bis 0,3.

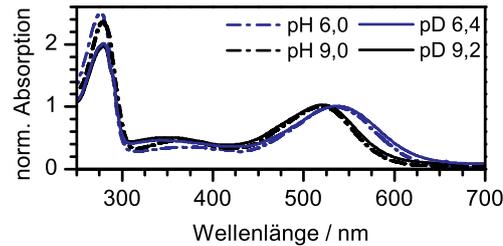


**Abbildung 7.3:** pH-Titration von PR in einem Mischpuffer aus jeweils 20 mM Citrat, Phosphat, Borat und TRIS sowie 500 mM NaCl.

Sowohl die transienten Absorptionmessungen im sichtbaren wie auch im infraroten Spektralbereich wurden mit einer Anregungswellenlänge von 525 nm durchgeführt. Diese wurde in beiden Fällen über den nichtlinearen Konversionsprozess des NOPA-Aufbaus realisiert. Die Pulsenergie lag für die Anreg-Abtast-Experimente im sichtbaren Spektralbereich bei 50 nJ. Die Pulse wurden mit einem Fokaldurchmesser von etwa 100  $\mu\text{m}$  in die Probe fokussiert. Der Abtastpuls wurde in einem Saphir-Substrat erzeugt und ein Messbereich von 430 nm bis 750 nm ausgewählt. Anreg- und Abtastpuls wiesen parallele Polarisierung auf. Um den Probenaustausch zu gewährleisten, wurde die Probe in einer 0,1 mm dicken Quarzglasküvette lateral bewegt. Das Abtastlicht der transienten Absorptionmessungen im infraroten Spektralbereich wurde über die in Kapitel 3.4.2 beschriebenen nichtlinearen Prozesse zwischen 1490  $\text{cm}^{-1}$  und 1690  $\text{cm}^{-1}$  generiert. Für die Anregung wurden im Bereich von 1490  $\text{cm}^{-1}$  bis 1580  $\text{cm}^{-1}$  Pulsenergien von 100 nJ benutzt, während die Pulsenergie im Bereich von 1590  $\text{cm}^{-1}$  bis 1680  $\text{cm}^{-1}$  400 nJ betrug. Anreg- und Abtaststrahl waren auch in diesem Experiment parallel polarisiert. Die Probe wurde in einer 50  $\mu\text{m}$  dicken Küvette durch Translations- und Rotationsbewegungen zwischen den Laserschüssen ausgetauscht.

## UV-vis-Absorptionsspektroskopie

Die statischen UV-vis-Spektren in deuteriertem Lösungsmittel zeigen die in der Literatur bekannte pH-abhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Spektren in H<sub>2</sub>O erkennbar. Man kann daher davon ausgehen, dass der H/D-Austausch keine signifikanten Einflüsse auf die Absorptionseigenschaften des Chromophors hat.

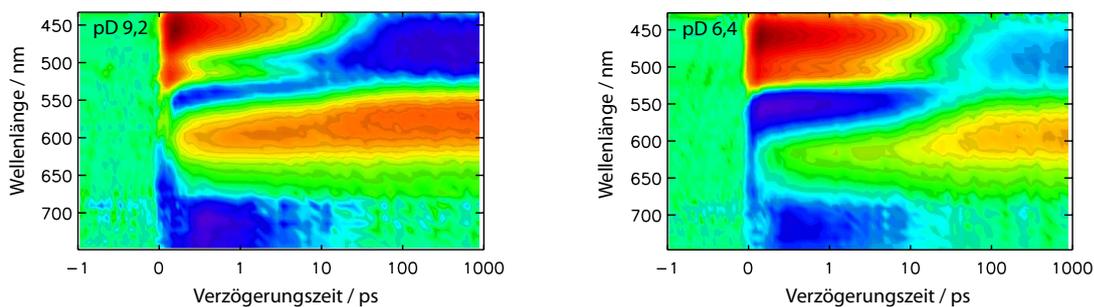


**Abbildung 7.4:** Vergleich der normierten Absorptionsspektren von PR unter alkalischen (schwarz) und sauren (blau) Bedingungen. Die Spektren in H<sub>2</sub>O (strichpunktierte Linie) und D<sub>2</sub>O (durchgezogene Linie) zeigen eine hohe Übereinstimmung.

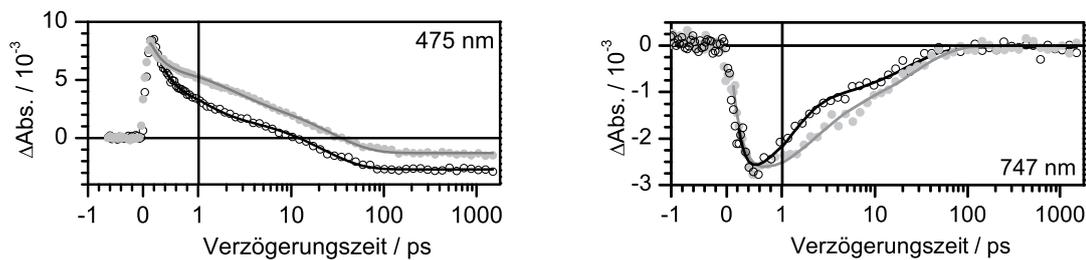
## Transiente Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich

Abbildung 7.5 gibt eine Übersicht über die erhaltenen transienten Absorptionsänderungen von PR bei pD 9,2 und pD 6,4 nach Photoanregung bei 525 nm. Hierbei sind positive Absorptionsänderungen rot kodiert und negative blau. Die x-Achse ist bis +1 ps linear skaliert und wird danach logarithmisch weitergeführt.

Die Differenzspektren beider pD-Werte zeigen gut aufgelöste Beiträge in vier spektralen Regionen. Ein positives Differenzsignal, das der Absorption des angeregten Zustands zugeordnet werden kann, wird um 450 nm beobachtet. Die Signatur bildet sich direkt nach der Anregung und zerfällt abhängig vom pD-Wert auf einer 10 ps-Zeitskala. Am roten



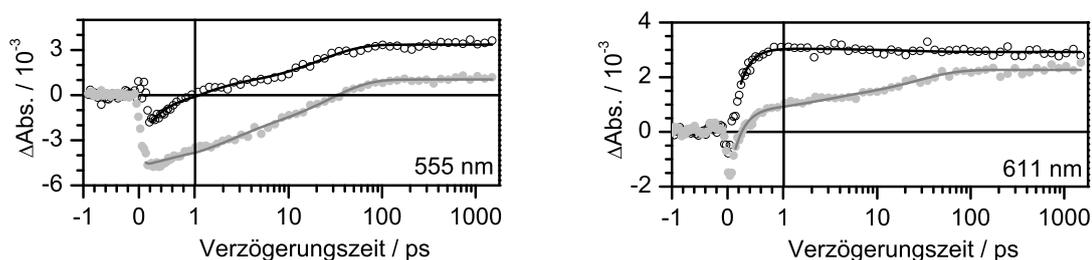
**Abbildung 7.5:** Transiente Absorptionsänderungen von solubilisiertem PR in D<sub>2</sub>O bei pD 9,2 und 6,4 nach Photoanregung bei 525 nm. Die Hauptbeiträge entsprechen der Absorption des angeregten Zustands, dem Grundzustandsbleichen, der Bildung des Photoproduktes sowie der stimulierten Emission.



**Abbildung 7.6:** Transiente Absorptionsänderungen von solubilisiertem PR in D<sub>2</sub>O bei pH 9,2 (○) und 6,4 (●) im Bereich der Absorption des angeregten Zustands (475 nm) und der stimulierten Absorption (747 nm). Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit der Daten.

Flügel des beobachteten Wellenlängenbereichs ( $\lambda \geq 700$  nm) zeigen beide Proben negative Absorptionsänderungen, die der stimulierten Emission zugeordnet werden können. Diese erscheinen auch mit dem Zeitnullpunkt und zerfallen auf der gleichen Zeitskala wie die Absorption des angeregten Zustands.

Der Contourplot der pH 9,2 Probe zeigt um 550 nm bei kurzen Verzögerungszeiten das schwach negative Signal des Grundzustandsbleichens, das an der blauen Flanke fast vollständig von der Absorption des angeregten Zustands überlagert wird. Nach dem Zerfall dieses S<sub>1</sub>-Beitrags erscheint das Grundzustandssignal in Bezug auf das statische Absorptionsspektrum blau verschoben, was daran liegt, dass sich auf einer 10 ps Zeitskala um 570 nm ein weiterer positiver Beitrag aufbaut. Dieser kann der Absorption des ersten Photoproduktes, des K-Intermediats, zugeordnet werden. Eine andere Charakteristik ist bei der pH 6,4-Probe erkennbar. Das Grundzustandsbleichen ist hier aufgrund der im Absorptionsspektrum rotverschobenen Bande deutlich zu erkennen. Hierdurch kommt es aber auch zu einem wesentlich größeren Überlapp zwischen der K-Photoproduktbande und der S<sub>0</sub>-Bleichbande, wodurch sich bei langen Verzögerungszeiten ein im Vergleich zur pH 9,2-Probe wesentlich geringeres Differenzsignal ergibt.



**Abbildung 7.7:** Transiente Absorptionsänderungen von solubilisiertem PR in D<sub>2</sub>O bei pH 9,2 (○) und 6,4 (●) im Bereich des Grundzustandsbleichens (555 nm) sowie der Absorption des Photoproduktes (611 nm). Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit.

**Globale Fitanalyse der Kurzzeitdaten des sichtbaren Spektralbereichs**

Um der beobachteten Dynamik Prozesse zuordnen zu können, wurde eine globale Fitprozedur durchgeführt. Die Daten konnten optimal mit vier Zeitkonstanten angepasst werden. Diese sind in Tabelle 7.1 aufgeführt. Die kürzeste Zeitkonstante von etwa 150 fs wird im Folgenden nicht weiter diskutiert, da sie im Bereich der Zeitauflösung dieses Experiments liegt und somit kohärente Effekte durch die Überlappung von Anreg- und Abtastpuls enthält. Zudem sind in diesem Zeitbereich Wellenpaketsbewegungen und die dynamische Stokesverschiebung zu erwarten, die nicht über eine monoexponentielle Zerfallsfunktion beschrieben werden können, sodass die Aussagekraft des zerfallassozierten Spektrums der kürzesten Komponente fraglich ist. Die Zeitkonstante ist dennoch notwendig, um die Daten optimal anzupassen.

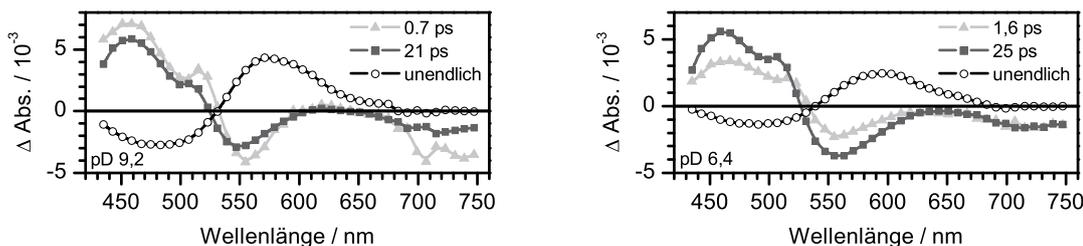
	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_\infty$
sol. PR pD 9,2	<0.15	0,7	21	unendlich
sol. PR pH 9,0	0.14	0,28	9,5	unendlich
rek. PR pH 9,0	<0.2	0,4	8	unendlich
sol. PR pD 6,4	0,15	1,6	25	unendlich
sol. PR pH 6,0	0,15	1,0	16,2	unendlich
rek. PR pH 6,0	0,15	0,7	15	unendlich

**Tabelle 7.1:** Erhaltene Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten im sichtbaren Spektralbereich von PR bei pD 9,2 und 6,4. Zum Vergleich sind die erhaltenen Zeitkonstanten von Messungen an solubilisiertem und rekonstituiertem PR in undeutertem Puffer gegeben [272, 273].

Ein Vergleich der erhaltenen Zeitkonstanten mit denen aus transienten Absorptionmessungen von solubilisiertem und rekonstituiertem PR in H<sub>2</sub>O [272, 273] zeigt, dass die erhaltenen Zerfallszeiten in deuteriertem Medium ungefähr um einen Faktor 2 höher liegen. Dies kann dem kinetischen Isotopeneffekt zugeschrieben werden und ist in Übereinstimmung mit kinetischen Studien von Szakacs et al. [280], die für die Ionen pumpenden Retinalproteine Halorhodopsin (HR), BR und PR gezeigt haben, dass Übergänge, bei denen keine Wasserstoffbrückenbindungen verändert werden und/oder keine Protonenbewegungen auftreten, moderate Isotopeneffekte von 1,5 bis 2 zeigen.

Die zerfallassozierten Spektren der Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  (Siehe Abbildung 7.8) zeigen Beiträge des Zerfalls der Absorption des angeregten Zustands und der stimulierten Emission. Der mit dieser Zeit verbundene Prozess ist daher die Depopulation des angeregten Zustands. Da zudem eine negative Amplitude im Bereich um 550 nm zu sehen ist, findet mit diesen Prozessen auch die Rückpopulierung des Grundzustandes und/oder die Bildung des K-Intermediats statt. Interessanterweise weist im Falle der pD 9,2-Probe das Spektrum der  $\tau_2$ -Komponente die größere Amplitude auf, während für pD 6,4 das Amplitudenspektrum der  $\tau_3$ -Zeit deutlich dominiert. Dies kann so interpretiert werden, dass der schnellere S<sub>1</sub>-Entvölkerungskanal im Alkalischen favorisiert wird, während der langsamere Kanal im Sauren präferiert ist.

Das zerfallassozierte Spektrum der unendlich-Komponente spiegelt das Differenzspektrum bei 1,5 ns wider. In beiden Fällen ist das Differenzsignal aus negativem Grundzustandsbleichen und positiver K-Intermediatsabsorption erkennbar. Die Amplitude ist aber für die PR-Probe bei pD 9,2 signifikant höher. Mögliche Erklärungen hierfür wären zum einen die verschobene Grundzustandsabsorptionsbande, sowie eine veränderte Quantenausbeute der K-Bildung. Hierauf wird detaillierter nach der Beschreibung der transienten Absorptionsänderung im infraroten Spektralbereich eingegangen.



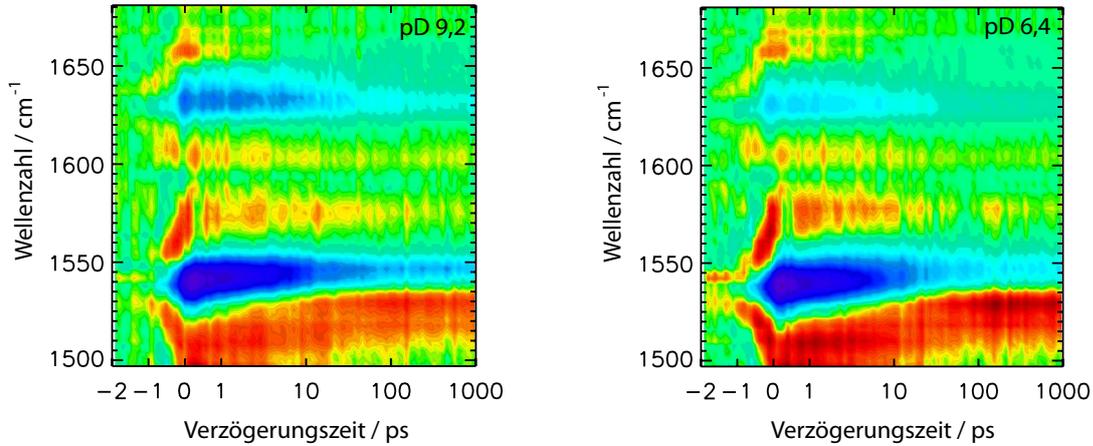
**Abbildung 7.8:** Zerfallassozierte Spektren im sichtbaren Spektralbereich von PR in D<sub>2</sub>O bei pD 9,2 und 6,4.

### Transiente Absorptionsmessungen im infraroten Spektralbereich

Im infraroten Spektralbereich wurden transiente Absorptionsmessungen an PR-Proben bei pD 9,2 und pD 6,4 im Bereich der C=C- ( $1490\text{ cm}^{-1}$  –  $1580\text{ cm}^{-1}$ ), sowie der C=N-Streckschwingung der protonierten Schiffbase ( $1590\text{ cm}^{-1}$  –  $1680\text{ cm}^{-1}$ ) durchgeführt. Die Proben wurden dabei nacheinander unter Beibehaltung der optischen Geometrie gemessen, sodass die Datensätze der einzelnen spektralen Bereiche direkt verglichen werden können. Die beobachteten Banden wurden anhand von bereits publizierten Tieftemperaturmessungen zugeordnet [30, 256, 257].

Abbildung 7.9 gibt einen Überblick über die beobachteten Absorptionsänderungen. Photoinduzierte Differenzbanden sind hierbei zu positiven Verzögerungszeiten zu beobachten, Effekte vor dem Zeitnullpunkt sind auf den gestörten freien Induktionszerfall zurückzuführen. Das Signal um  $t_D=0$  ist neben diesen beiden Effekten noch durch die Kreuzphasenmodulation zwischen Anreg- und Abtastpuls bestimmt. In blau kolorierte Banden zeigen negative Absorptionsänderungen auf, photoinduzierte positive Absorptionsänderungen sind in rot dargestellt.

Im Bereich zwischen  $1490\text{ cm}^{-1}$  und  $1580\text{ cm}^{-1}$  ist für PR bei pD 9,2 nach Anregung eine negative Bleichbande bei  $1542\text{ cm}^{-1}$  erkennbar, die, da zu negativen Verzögerungszeiten ein Signal des gestörten freien Induktionszerfalls auftritt, der Depopulation einer Schwingungsbande des Chromophors zugeschrieben werden muss. Im Einklang mit der Literatur [30, 256, 257] wird sie der C=C-Streckschwingung des Retinalchromophors zugeordnet. Wie Abbildung 7.10 anschaulich zeigt, geht das Bleichsignal auf einer 30 ps-Skala zurück. Das Maximum der Bleichbande verschiebt sich im Observationszeitraum

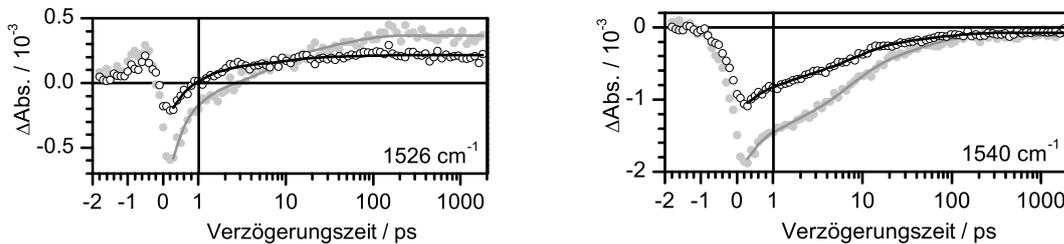


**Abbildung 7.9:** Transiente Absorptionsänderungen von PR in D<sub>2</sub>O bei pD 9,2 und 6,4 nach Anregung bei 525 nm im Bereich von 1490 cm<sup>-1</sup> bis 1680 cm<sup>-1</sup>. Hauptbeiträge entstammen den photoinduzierten Änderungen der C=C- und C=N-Streckschwingung des Retinalchromophors.

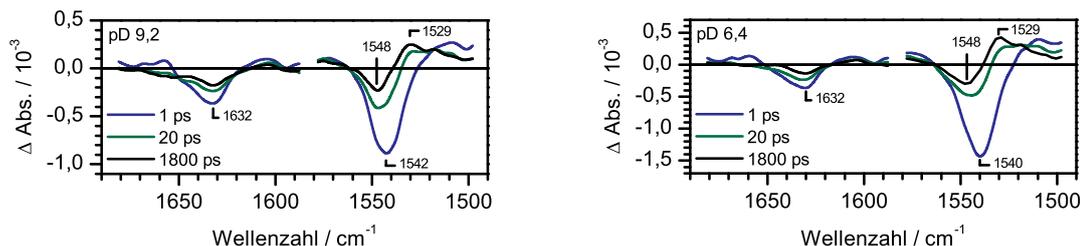
auf 1548 cm<sup>-1</sup>, wobei sich auch die Breite der Differenzbande ändert. Überlagert wird die eben beschriebene Signatur von einer dominanten positiven Bande um 1510 cm<sup>-1</sup>, die aufgrund der Rotverschiebung bei kurzen Verzögerungszeiten der C=C-Streckschwingung des Retinals im angeregten Zustand zugeschrieben wird. Während der ersten 50 ps erfährt diese Signatur eine Blauverschiebung zu (+)1529 cm<sup>-1</sup>.

Zu längeren Verzögerungszeiten ist diese Bande kennzeichnend für die wahrscheinlich noch schwingungsangeregte Grundzustandsbande des K-Intermediats, die in Gleichgewichtsmessungen zwischen 1523 cm<sup>-1</sup> und 1514 cm<sup>-1</sup> gefunden wurde [30, 253, 256, 257, 260]. Das Differenzspektrum bei 1,8 ns weist zudem eine Schulter bei 1518 cm<sup>-1</sup> auf. Diese kann nicht eindeutig zugewiesen werden. Eine Zuordnung zu einer Amid II-Änderung von nicht-ausgetauschten Peptidgruppen erscheint aber plausibel.

An der blauen Flanke des beobachteten Spektralbereichs tritt direkt nach Anregung



**Abbildung 7.10:** Transiente Absorptionsänderungen von solubilisiertem PR in D<sub>2</sub>O bei pD 9,2 (○) und 6,4 (●) bei 1526 cm<sup>-1</sup> und 1540 cm<sup>-1</sup>. Die Rückkehr der ausgebleichten C=C-Streckschwingung des Retinals sowie die Bildung der zugehörigen rotverschobenen Produktsignatur sind gezeigt. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit.

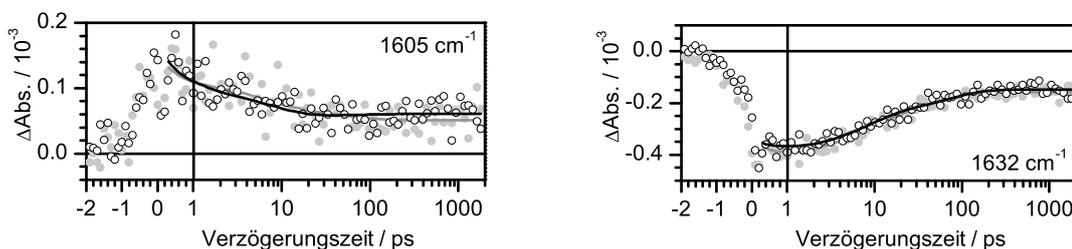


**Abbildung 7.11:** Transiente Spektren nach 1 ps, 20 ps und 1800 ps von PR bei pD 9,2 (links) und 6,4 (rechts). Bis auf die pH-abhängige Verschiebung der C=C-Streckschwingung des Ausgangszustands sind keine wesentlichen zeitlichen und spektralen Unterschiede zwischen beiden Proben erkennbar.

zwischen  $1560 \text{ cm}^{-1}$  und  $1570 \text{ cm}^{-1}$  eine weitere schwache positive Differenzbande auf (Siehe 7.11). Eine Zuordnung auf der Basis von Literaturspektren kann nicht vorgenommen werden, da diese Bande nicht weiter beschrieben ist.

Der zeitliche Verlauf der Absorptionsänderungen der pD 6,4-Probe unterscheidet sich nur unwesentlich von den bereits für pD 9,2 beschriebenen (Siehe Abbildung 7.11). Abweichungen beruhen hauptsächlich auf unterschiedlichen Probenkonzentrationen, bzw. dem pH-abhängigen Schieben der C=C-Streckschwingung. Die Bandenposition des instantanen Bleichsignals dieser Bande ist bei pD 6,4 um etwa einen Kanal ( $3 \text{ cm}^{-1}$ ) auf  $1540 \text{ cm}^{-1}$  verschoben. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der für Retinalproteine gefundenen empirischen Beobachtung einer linearen Abhängigkeit des sichtbaren Absorptionsmaximums und der Position der C=C-Streckschwingung ( $\approx -4 \text{ nm/cm}^{-1}$ ).

Im Spektralbereich zwischen  $1590 \text{ cm}^{-1}$  und  $1680 \text{ cm}^{-1}$  zeigen die PR-Proben eine hohe Proteinabsorption (Amid I) sowie kleinere Differenzsignale, was dazu führt, dass die beobachteten transienten Absorptionsänderungen ein geringeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen. Da für die Messungen in diesem Bereich eine höhere Anregungsenergie benutzt wurde ( $400 \text{ nJ}$  anstatt  $100 \text{ nJ}$  für den C=C-Bereich) lassen sich die relativen Amplituden nicht mit denen der Abtastwellenlängen zwischen  $1490 \text{ cm}^{-1}$  –  $1580 \text{ cm}^{-1}$  vergleichen. Wie die Übersichtsgraphiken in Abbildung 7.9 zeigen, sind grundsätzlich drei Signale

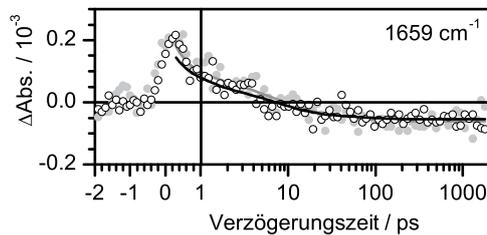


**Abbildung 7.12:** Transiente Absorptionsänderungen von solubilisiertem PR in  $\text{D}_2\text{O}$  (pD 9,2 ( $\circ$ ) und 6,4 ( $\bullet$ )) bei  $1605 \text{ cm}^{-1}$  und  $1632 \text{ cm}^{-1}$ . Die zeitliche Änderung der ausgebleichten C=N-Streckschwingung sowie einer Produktbande sind beschrieben. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit.

erkennbar. Im Zentrum des beobachteten Bereichs liegt die negative Absorptionsänderung um  $1632\text{ cm}^{-1}$ . Während der ersten 100 ps ist ein Rückgang des Bleichens erkennbar, das auf einem konstanten Niveau von etwa  $0,15 \cdot 10^{-3}$  endet.

Aufgrund der Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls entspricht auch diese Bande einer gebleichten Grundzustandsschwingung. Sie wird in der Literatur der C=N-Streckschwingung der Schiffbasen-Verknüpfung zugeschrieben. Aufgrund der Kopplung dieser Bande an die N-H- bzw. N-D-Biegeschwingung ist sie stark lösungsmittelabhängig ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ) [253, 256, 257]. Die Zentralwellenlänge verschiebt sich in  $\text{H}_2\text{O}$  um  $\approx 22\text{ cm}^{-1}$  zu höheren Wellenzahlen.

Rotverschoben zu dieser Bande beobachtet man eine positive Signatur um  $1605\text{ cm}^{-1}$ , die den gleichen Zeitverlauf wie die C=N-Bleichbande aufweist. Die positive Absorptionsänderung am Ende des Beobachtungszeitraums wird der C=N-Streckschwingung des K-Intermediats zugeordnet. Die Charakteristik um  $1659\text{ cm}^{-1}$  weicht signifikant von den bereits diskutierten Bereichen ab. Nach Photoanregung ist ein positives Signal beobachtbar, das auf einer Zeitskala von wenigen Pikosekunden zerfällt und nach etwa 20 ps ein konstant negatives Differenzsignal aufweist. Eine ähnliche Bande wurde auch in Tieftemperatur-FTIR-Experimenten an PR [253, 256, 257], wie auch durch Kurzzeit-IR-Spektroskopie an BR [169] beobachtet und dort Amid I-Signalen des Proteinrückgrats zugeordnet worden. Wie die transienten Absorptionsänderungen der Einzelkanäle in den Abbildungen 7.12 und 7.13 zeigen, ist die beobachtete Dynamik auch in diesem Spektralbereich nicht pH-abhängig.



**Abbildung 7.13:** Transiente Absorptionsänderungen von solubilisiertem PR in  $\text{D}_2\text{O}$  bei pH 9,2 (○) und 6,4 (●) im Bereich der Amid I-Schwingung. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit.

### *Globale Fitanalyse der Kurzzeitdaten des infraroten Spektralbereichs*

Um die Beobachtung der im infraroten Spektralbereich pH-unabhängigen Dynamik weiter zu festigen, wurde eine globale Fitanalyse (Siehe Kapitel 3.4.1) mit einer variierenden Anzahl an Zeitkonstanten durchgeführt. Diese zeigte, dass der prinzipielle Datenverlauf mit drei Zeitkonstanten beschrieben werden kann. Der Vergleich der erhaltenen Zeitkonstanten und der  $\chi^2$ -Werte, die die Qualität des Fits anzeigen, ergab jedoch eine signifikante Verbesserung bei der Beschreibung durch eine Anpassung mit vier Zeitkonstanten. Im Gegensatz hierzu beeinflusst ein Fit mit fünf Zeitkonstanten lediglich noch die unendlich-Zeitkomponente, die in zwei Zeitkonstanten aufgespalten wird, nämlich

	$\tau_1/\text{ps}$	$\tau_2/\text{ps}$	$\tau_3/\text{ps}$	$\tau_4/\text{ps}$	$\tau_\infty$	$\chi^2/10^{-6}$
sol. PR pD 9,2	1,1	17	-	-	unendlich	3,20
sol. PR pD 9,2	0,6	7	66	-	unendlich	2,84
sol. PR pD 9,2	0,6	7	54	4800	unendlich	2,76
sol. PR pD 6,4	1,2	17	-	-	unendlich	5,91
sol. PR pD 6,4	0,5	6	46	-	unendlich	5,01
sol. PR pD 6,4	0,4	6	40	3200	unendlich	4,91

**Tabelle 7.2:** Vergleich der Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der transienten IR-Daten von PR bei pD 9,2 und 6,4 bei einer Anpassung mit drei, vier und fünf Zeitkonstanten.

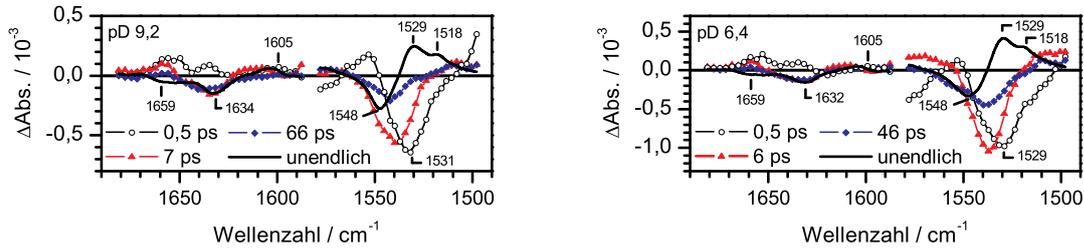
die unendlich-Zeit und eine Zeitkonstante im Bereich einiger Nanosekunden, die damit aber immer noch viel größer als die maximale Verzögerungszeit ist. Man kann daraus schließen, dass eine Anpassung mit vier Zeitkonstanten die beste Beschreibung der Daten liefert.

Wie die Auflistung der erhaltenen Zerfallszeiten in Tabelle 7.2 zeigt, sind die Zeitkonstanten im Rahmen des Fehlers jeweils für beide pH-Werte gleich. Betrachtet man nun die zerfallassozierten Spektren der Anpassung mit vier Zeitkonstanten (Abbildung 7.14), so sieht man, dass auch die spektrale Signatur der Amplitude bis auf die Verschiebung im Bereich der C=C-Streckschwingung identisch ist. Die Amplitudenspektren werden daher für pD 9,2 und pD 6,4 zusammen diskutiert.

Das Amplitudenspektrum der unendlich-Komponente repräsentiert das Differenzspektrum des K-Intermediats und des Grundzustands. Im Bereich der C=C-Streckschwingung treten Produktbanden bei (+)1529  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Schulter bei (+)1518  $\text{cm}^{-1}$  auf. Die gebleichte C=C-Grundzustandsbande liegt bei 1548  $\text{cm}^{-1}$ . Im Bereich zwischen 1590  $\text{cm}^{-1}$  und 1680  $\text{cm}^{-1}$  beschreibt das Amplitudenspektrum der unendlich-Komponente die Grundzustandsbande der C=N-Streckschwingung um (-)1635  $\text{cm}^{-1}$  sowie die zugehörige rotverschobene Photoproduktbande bei (+)1605  $\text{cm}^{-1}$ . Daneben weist die negative Signatur im Bereich der Amid I-Schwingung ((-)1659  $\text{cm}^{-1}$ ) auf eine strukturelle Änderung im Protein hin.

Die Zerfallszeiten der übrigen Zeitkonstanten können nicht eindeutig molekularen Übergängen wie dem  $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang zugeordnet werden, da sie von Vorgängen wie der internen Energieumverteilung in niederfrequente Moden oder Kühlprozessen, d.h. der Energieabgabe an das Bad, überlagert werden. Dies führt dazu, dass man sowohl im angeregten Zustand als auch im Grundzustand "heiße", d.h. schwingungsangeregte Moleküle beobachtet. Die Senkung der intramolekularen Temperatur entspricht im Spektrum der Änderung der Differenzbanden bezüglich ihrer Position und inhomogenen Linienbreite, was wiederum zu nicht-exponentiellem kinetischen Verhalten führt, welches mit dem benutzten Modell nur unzureichend beschrieben werden kann. Dennoch gibt eine solche Datenanpassung wichtige Einblicke in die beobachteten Prozesse.

Die dominante negative Bande um 1540  $\text{cm}^{-1}$  in den zerfallassozierten Spektren von



**Abbildung 7.14:** Zerfallsspektren der Anpassung der Datensätze von PR bei pD 9,2 und pD 6,4 im infraroten Spektralbereich mit vier Zeitkonstanten.

$\tau_2$  und  $\tau_3$  kann aufgrund der Übereinstimmung mit der Position und Bandenform des instantanen Bleichsignals der C=C-Streckschwingung der biexponentiellen Rückbildung des Ausgangszustands über oben beschriebene Kühlprozesse zugeordnet werden. Analoges gilt für den Bereich der C=N-Streckschwingung. Auch hier weisen die Amplitudenspektren von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  beider pD-Werte negative Banden im Bereich der Grundzustandsabsorption auf.

Im Bereich der C=C-Schwingung weicht das Amplitudenspektrum der kürzesten Zerfallskonstante  $\tau_1$  signifikant von dem Spektrum der Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  ab. Die Minima bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  und  $1518\text{ cm}^{-1}$  stimmen mit den Positionen des  $\text{PR}_K$ -Produktbandes im Bereich der C=C-Streckschwingung überein. Dies deutet darauf hin, dass der Aufbau der Photoproduktsignatur beschrieben wird. Diese Interpretation wird von der Tatsache unterstützt, dass die transiente Absorptionsänderung bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 7.10), die den Übergang zwischen dem anfänglichen negativen Beitrag in die positive Photoproduktsignatur aufzeigt, von der kürzesten Zeitkonstante dominiert wird. Ein ähnliches Verhalten beobachtet man auch in der zeitlichen Entwicklung oberhalb von  $1570\text{ cm}^{-1}$  für pD 6,4 bzw. oberhalb von  $1564\text{ cm}^{-1}$  für pD 9,2. Obgleich der  $\tau_1$ -Prozess mit der K-Bildung einhergeht, ist das zerfallsspektren kein exaktes Spiegelbild des  $\text{PR}_K$ -PR-Differenzspektrums, was zeigt, dass dieser Zerfallskanal nicht ausschließlich für die Bildung des Photoprodukts verantwortlich ist. Es kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Photoprodukt-Bildungskanäle einerseits auf kürzeren Zeitskalen zu finden sind und daher in dem durchgeführten Experiment nicht aufgelöst werden können, bzw. auf längeren Zeiten von den durch  $\tau_2$  und  $\tau_3$  beschriebenen Kühlprozessen überlagert werden.

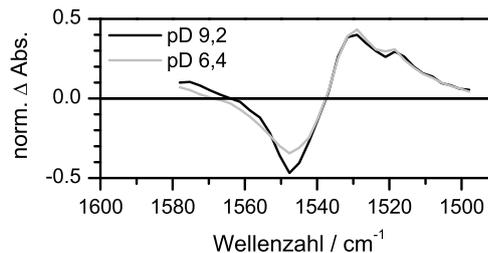
Eine dem C=C-Signal ähnliche Photoprodukt-Bildungskomponente tritt im Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  im Bereich der C=N-Schwingung nicht auf. Allerdings ist durch die kleine Signalhöhe der Produktbande und das geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses die Genauigkeit des Fits herabgesetzt und das Amplitudenspektrum daher nicht genügend aufgelöst. Demgegenüber ist der Bereich der Amid I-Schwingung besser aufgelöst. Die Bildung der negativen Proteinsignatur ist dominant mit den Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , sowie untergeordnet mit  $\tau_3$  verknüpft.

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus Schwingungsspektroskopie und elektronischer Spektroskopie benutzt um die Primärdynamik des bakteriellen Retinalproteins PR zu untersuchen. Da die Messungen unter identischen Probenbedingungen (Proteinpräparation und Puffer) durchgeführt wurden, können die ultraschnellen Prozesse nach Photoanregung vergleichend analysiert werden.

### Quantenausbeute der *K*-Intermediatsbildung

Wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt wurde, konnten im infraroten und sichtbaren Spektralbereich unterschiedliche Informationen über die zeitliche und spektrale Charakteristik nach Photoanregung gewonnen werden. Auf der einen Seite wurden im sichtbaren Spektralbereich pD-abhängige spektrale Unterschiede beobachtet, die auf das Schieben der Hauptabsorptionsbande des Retinalchromophors bei Titration des primären Protonenakzeptors Asp-97 zurückzuführen sind. Diese Verschiebungen sind im infraroten Spektralbereich wie der Vergleich der transienten Spektren bei  $t=0$  zeigt lediglich im Bereich der C=C-Streckschwingung beobachtbar und betragen dort nur ca.  $3\text{ cm}^{-1}$ . Das  $\text{PR}_K$ -PR -Differenzspektrum ist daher nahezu unbeeinflusst vom pH-Wert der Probe und damit vom veränderten Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk bzw. von elektrostatischen Wechselwirkungen. Dies bietet die Möglichkeit, die Quantenausbeute der *K*-Intermediatsbildung im Infraroten abzuschätzen, während dies im sichtbaren Spektralbereich nur eingeschränkt möglich ist. Da das Bleichsignal bei  $t=0$  proportional zu der Anzahl angeregter Moleküle ist, können die transienten IR-Spektren hierauf normiert werden, um anschließend die Quantenausbeute an der unendlich-Komponente des Fits bzw. den transienten Spektren bei 1,8 ns zu berechnen. Der Vergleich dieser Spektren in Abbildung 7.15 zeigt, dass die Quantenausbeute der Photoproduktbildung unabhängig vom pH-Wert ist.



**Abbildung 7.15:** Vergleich der auf das Bleichsignal zum Zeitnullpunkt normierten transienten Spektren bei 1,8 ns von PR bei pD 9,2 und 6,4 im Bereich der C=C-Streckschwingung.

Dies beweist aber auch, dass die für die pD-Werte unterschiedlichen Amplituden des *K*-Differenzspektrums im sichtbaren Spektralbereich überwiegend vom Schieben der Absorptionsbande des Retinals bestimmt werden. Um dies weiter zu validieren, wurden diese Spektren mit der Summe aus zwei flächennormierten Gaußfunktionen angepasst.

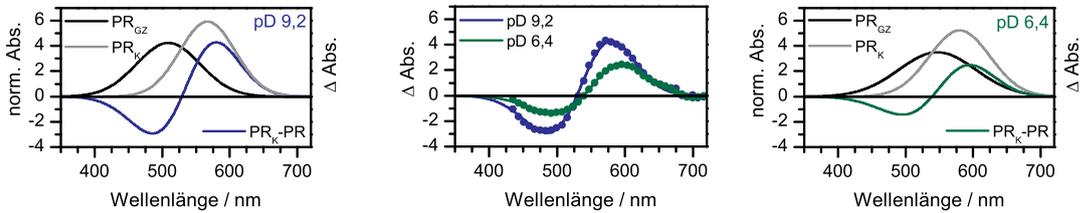
Probe	$A_1$	$x_{C1} / \text{nm}$	$w_1 / \text{nm}$	$A_2$	$x_{C2} / \text{nm}$	$w_2 / \text{nm}$
pD 9,2	0,5	$509 \pm 2$	$94 \pm 5$	$0,61 \pm 0,01$	$567 \pm 2$	$82 \pm 3$
pD 6,4	0,5	$547 \pm 3$	$114 \pm 5$	$0,59 \pm 0,01$	$580 \pm 3$	$90 \pm 1$

**Tabelle 7.3:** Fitparameter der Anpassung der transienten Spektren nach 1,5 ns mit einer Summe aus zwei flächennormierten Gaußfunktionen.  $A_1$  wurde dabei für beide pD-Werte jeweils auf den Wert 0,5 festgesetzt.

Für das Grundzustandsbleichsignal wurde dabei eine Amplitude von  $A_1 = A_2 = 0,5$  festgehalten. Alle weiteren Parameter wurden variabel gewählt. Tabelle 7.3 stellt die Ergebnisse der Anpassung dar.

$$y = \frac{A_1}{w \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot \exp - \frac{2 \cdot (x - x_{C1})^2}{(w_1)^2} + \frac{A_2}{w \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot \exp - \frac{2 \cdot (x - x_{C2})^2}{(w_2)^2} \quad (7.1)$$

Abbildung 7.16 zeigt, dass die spektrale Signatur der Differenzspektren durch diese Annahmen gut nachempfunden werden kann. Die Absorptionsmaxima des Grundzustands stimmen mit den in statischen UV-vis-Spektren gefundenen Werten überein (Vgl. Abbildung 7.3). Die Absorptionsmaxima der K-Zustände liegen entsprechend bei etwa 570 nm für die alkalische PR-Probe bzw. 580 nm für die saure PR-Probe. Das wichtigste Ergebnis ist jedoch, dass die Amplitude der Produktbande ( $A_2$ ) sowohl für pD 9,2 als auch für pD 6,4 auf einen Wert von 0,6 angepasst wurde, was einer pD-unabhängigen Quantenausbeute entspricht. Die Quanteneffizienz der Primärdynamik ist somit nicht vom Protonierungszustand des primären Protonenakzeptors beeinflusst.



**Abbildung 7.16:** Abschätzung der Quantenausbeute der  $PR_K$ -Bildung im sichtbaren Spektralbereich. Die in der mittleren Abbildung dargestellten transienten Spektren bei 1,5 ns wurden hierfür mit einer Summe aus zwei flächennormierten Gaußfunktionen angepasst. Die zwei Gaußfunktionen und das zugehörige Differenzspektrum sind links und rechts für pD 9,2 sowie pD 6,4 gezeigt.

### *Interpretation der Dynamik*

Die globale Fitanalyse der Anreg-Abtast-Experimente im sichtbaren Spektralbereich ergibt, dass eine Anpassung mit vier Zeitkonstanten ein zufriedenstellendes Ergebnis liefert. Die Zeitkonstanten zeigen eine geringere pD-Abhängigkeit, als dies für die Proben in H<sub>2</sub>O gefunden wurde [272, 273]. Die Interpretation der beobachteten Kinetik kann aber gut in das bereits bestehende Modell der Primärreaktion eingefügt werden. Hiernach beschreibt die kürzeste Zeitkonstante  $\tau_1$  eine Wellenpaketsbewegung aus der Franck-Condon-Region heraus. Folgt man den theoretischen Überlegungen am Modellsystem BR, so verläuft der nachfolgende Übergang zum elektronischen Grundzustand hauptsächlich über die C=C-Streck- sowie eine Torsionskoordinate [195]. Im vorliegenden Fall erfolgt dieser Übergang biphasisch über zwei Zerfallskanäle ( $\tau_2$  und  $\tau_3$ ). Dies kann am einfachsten über eine weitere Potentialhürde im angeregten Zustand beschrieben werden, die dafür sorgt, dass ein Teil der Population nicht direkt durch die konische Durchschneidung den Grundzustand erreicht. Die Umkehr der Amplitudenverhältnisse im Bereich der Absorption des angeregten Zustands sowie der stimulierten Emission in den zerfallassozierten Spektren (Abbildung 7.8) legen zudem die Vermutung nahe, dass im alkalischen Fall der schnelle Kanal präferiert wird, während bei sauren pD-Werten der langsamere Kanal vermehrt populiert ist. Lenz et al. [273] erklärten dies mit einer Verkipfung der S<sub>1</sub>-Potentialfläche. Beide S<sub>1</sub>-Zerfallskanäle bevölkern sowohl den all-*trans*-Ausgangszustand wie auch das 13-*cis*-Photoprodukt, dessen rot-verschobene Signatur im zerfallassozierten Spektrum der unendlich-Komponente ( $\tau_\infty$ ) beobachtbar ist.

Die globale Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten im infraroten Spektralbereich kann bei der experimentell erreichten Zeitaufösung und aufgrund der kohärenten Effekte um den Zeitnullpunkt erst ab etwa 0,3 ps durchgeführt werden. Eine dem Sichtbaren analoge  $\tau_1$ -Zeit kann daher nicht aufgelöst werden. Die Analyse der Daten wurde mit drei, vier und fünf Zeitkonstanten durchgeführt. Eine Anpassung der Daten mit drei Zerfallszeiten spiegelt bereits die generelle Charakteristik der Daten wider. Die Zeitkonstanten liegen hierbei in dem Bereich der sichtbaren Daten (Vgl. Tabellen 7.2 und 7.1). Eine optimale Beschreibung der Daten wird aber erst in einer Anpassung mit vier Zeitkonstanten erhalten. Dies bedeutet, dass die Daten im Infraroten eine Zeitkonstante mehr benötigen, um korrekt beschrieben zu werden. Da für die Messungen identische Proben benutzt wurden, können diese Unterschiede nicht durch variierende Probenbedingungen erklärt werden. Dieser Befund wird der Tatsache zugeschrieben, dass die transienten IR-Spektren durch lokale strukturelle Änderungen, interne Energieumverteilung auf niederfrequente Moden sowie Kühlprozesse stark beeinflusst werden. Diese Prozesse dominieren die transienten IR-Spektren und bestimmen dabei das Aussehen und die Position der Differenzbanden. Die globale Analyse der Daten im Bereich der C=C-Streckschwingung zeigte, dass die Photoproduktbildung mit der kürzesten Zeitkonstante  $\tau_1$  verknüpft ist. Leider kann aufgrund des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im Bereich von 1590 cm<sup>-1</sup> und 1680 cm<sup>-1</sup> keine sichere Aussage über den Beitrag der Photoproduktbildung der C=N-Schwingung gemacht werden. Es zeigte sich jedoch, dass die  $\tau_1$ -Zeit signifikant zur Bildung der negativen Amid I-Bande beiträgt. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit

Untersuchungen von Amsden et al. [281], die für rekonstituiertes PR in H<sub>2</sub>O, pH 9,5, zeigen konnten, dass sowohl die Isomerisierung des Chromophors als auch die Antwort des Proteinrückgrats in der Amid II-Region mit einer Zeitkonstante von 0,5 ps - 0,7 ps zusammenhängen. Die zerfallassozierten Spektren der nachfolgenden Komponenten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  stimmen im Bereich der C=C- sowie der C=N-Schwingung mit der spektralen Position und Form des Bleichsignals bei t=0 überein und können daher der biphasischen Repopulierung des relaxierten Grundzustands über Kühlprozesse zugeschrieben werden.  $\tau_2$  trägt zudem auch signifikant zur Bildung der negativen Amid I-Bande um 1650 cm<sup>-1</sup> bei. Eine pD-Abhängigkeit der Dynamik konnte jedoch im infraroten Spektralbereich nicht festgestellt werden. Die zerfallassozierten Spektren und die zugehörigen Zeitkonstanten sind für pD 9,2 und 6,4 praktisch identisch. Es muss daher gefolgert werden, dass die Prozesse, die man Infraroten beobachtet, nicht vom pD-Wert beeinflusst werden. Dies kann wie folgt erklärt werden. Zum einen sind die IR-Daten von Kühlprozessen dominiert. Diese überlagern höchstwahrscheinlich pD-abhängige Unterschiede. Zum anderen könnte es auch sein, dass die Schwingungsbanden, die in dieser Studie untersucht wurden, nicht direkt mit der Isomerisierungsordinate verknüpft sind. Beispielsweise spiegelt die C=C-Streckschwingung zwar die  $\pi$ -Elektronendelokalisierung des Retinals wider, diese ist aber nicht mit der Torsionsmode verknüpft. Ein weiterer Hinweis hierzu kommt aus einer BR-Studie, die zeigte, dass die Änderung der C=C-Streckschwingung nicht direkt die Isomerisierung aufzeigt [190]. Hierzu wurden die Differenzspektren des J-Intermediats von nativem BR und einer BR-Probe mit modifiziertem Retinal verglichen, in der die C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Isomerisierung über einen fünfgliedrigen Ring, der C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub> umfasst, geblockt wurde. Es zeigte sich, dass für beide Proben sehr ähnliche Differenzspektren erhalten wurden. Hingegen konnten Amsden et al. [281] zeigen, dass die Bildung des K-Intermediats bei pH 9,5 für die C=C- und C-C-Schwingung auf gleichen Zeitskalen abläuft. Weitere Studien in diesem Spektralbereich werden zeigen, ob dies auch unter sauren Bedingungen der Fall ist.

### ***Kinetischer Isotopeneffekt***

Die in dieser Arbeit durchgeführten transienten Absorptionsmessungen an PR in deuteriertem Lösungsmittel zeigen im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Messungen in H<sub>2</sub>O eine wesentlich schwächer ausgeprägte Abhängigkeit vom pD-Wert. Berechnet man den kinetischen Isotopeneffekt über die Bildung des Quotienten aus den Werten der Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$ , gemessen in D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O, so erkennt man, dass die Zeitkonstanten unter sauren Bedingungen in D<sub>2</sub>O um einen Faktor von 1,6 vergrößert sind, während sich unter alkalischen Bedingungen ein Faktor von 2,3 ergibt.

Da es bis dato keine hochaufgelöste Struktur von PR gibt, ist der strukturelle Ursprung dieses Befunds nicht klar. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass sich die Zusammensetzung der Wassercluster beim Übergang zwischen den pH-Werten ändert. Hiermit verbunden sind natürlich auch Änderungen des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks in der Bindetasche. Unterstützt wird diese Annahme von Tieftemperatur-FTIR-Experimenten, die pH-abhängige Unterschiede im Wasserstoffbrückenbindungsmuster erkennen. Da die

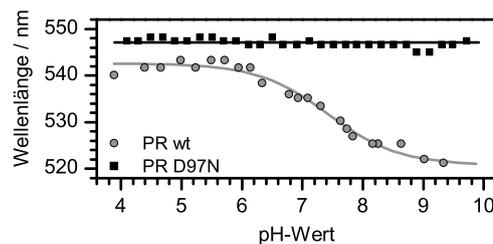


Die erzielten Ergebnisse dieses Abschnitts sind in folgende Publikation eingeflossen:

Verhoefen, M.-K., Neumann, K., Weber, I., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Primary Reaction Dynamics of Proteorhodopsin Mutant D97N Observed by Femtosecond Infrared and Visible Spectroscopy*. *Photochem. Photobiol.* (2009), **85**: 540-546.

### Experimentelle Vorgehensweise

Die Messungen wurden mit solubilisierter PR D97N-Probe durchgeführt, die von der Arbeitsgruppe von Prof. C. Glaubitz, Universität Frankfurt, präpariert wurde. Eine Beschreibung der Expression und Aufreinigungsprozedur findet man in [282]. Die Proben wurden für die Messungen in D<sub>2</sub>O-Puffer (20 mM TRIS, 100 mM NaCl) überführt. Da die D97N-Mutante eine kaum messbare pH-Abhängigkeit aufweist (Siehe Abbildung 7.18), wurden die Messungen bei neutralem pD-Wert (pD 7,4) durchgeführt. Die gewünschten Probenkonzentrationen wurden über Zentrifugalfiltration (Centriprep, 50 kD cut-off, Millipore) erreicht.



**Abbildung 7.18:** Titrationskurve von PR D97N im Vergleich zum PR wt. Der Datensatz der PR D97N-Titration wurde freundlicherweise von Thomas Köhler [283] zur Verfügung gestellt.

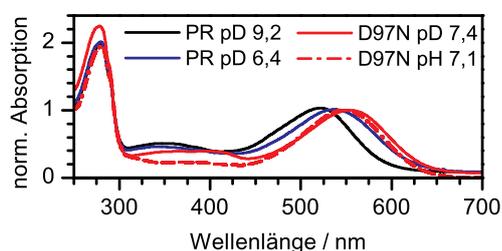
Für die sichtbar-Anreg-sichtbar-Abtast-Messungen wurden Anregungspulse mit einer zentralen Wellenlänge von 525 nm und einer Pulsenergie von 100 nJ über einen NOPA-Aufbau generiert und mit einem Fokaldurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  in die Probe fokussiert. Diese Wellenlänge wurde gewählt, da die D97N Mutante unter den gleichen Bedingungen wie das Wildtyp-Protein gemessen werden sollte. Zur Abtastung wurden Einzelfilament-Weißlichtpulse benutzt, die in einem Saphir-Substrat erzeugt wurden. Anreg- und Abtastpulse waren parallel zueinander polarisiert. Die erzielte Instrumentenantwort lag in etwa in einem Bereich von 150 fs, ein spektraler Bereich von 430 nm bis 750 nm wurde abgedeckt. Zum Probenaustausch zwischen den Laserschüssen wurde die Küvette (0,1 mm Schichtdicke, Quarzglas) lateral bewegt.

Die sichtbar-Anreg-IR-Abtast-Messungen wurden ebenfalls mit in einem NOPA generierten Anregungspulsen der Wellenlänge 525 nm und Pulsenergien von 150 nJ durchgeführt. Der Fokaldurchmesser betrug etwa 250  $\mu\text{m}$  in der Küvette. Breitbandige IR-Abtastpulse wurden wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben erzeugt und in die Küvette fokussiert (Fokaldurchmesser  $\sim 200 \mu\text{m}$ ). Es wurde im referenzierten Modus mit paralleler Polarisati-

on des Anreg- und Abtastpulses gemessen. Der Probenaustausch wurde durch gleichzeitige Rotation und Translation der Küvette (50  $\mu\text{m}$  Schichtdicke,  $\text{CaF}_2$ ) gewährleistet.

### UV-vis-Absorptionsspektroskopie

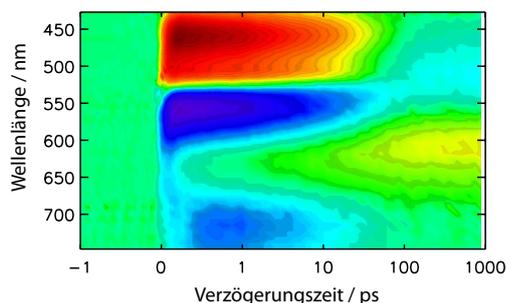
Abbildung 7.19 zeigt das Absorptionsspektrum von PR D97N in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer im Vergleich zum Wildtyp-Protein bei pD 9,2 und 6,4. Abweichungen vom Spektrum in  $\text{H}_2\text{O}$ -Puffer sind nicht erkennbar. Das Absorptionsmaximum des Retinalchromophors ist um 12 nm rotverschoben im Vergleich zu PR wt bei pD 6,4. Auch für die D97N-Mutante ist durch den H/D-Austausch kein signifikanter Einfluss auf die Absorptionseigenschaften im sichtbaren Spektralbereich erkennbar.



**Abbildung 7.19:** Vergleich der Absorptionsspektren von PR D97N und PR wt bei pD 9,2 und 6,4. Das Absorptionsspektrum der PR D97N-Mutante in  $\text{H}_2\text{O}$  wurde freundlicherweise von Thomas Köhler [283] zur Verfügung gestellt.

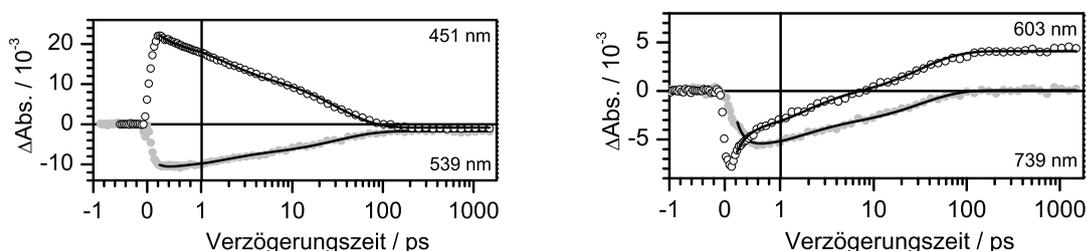
### Transiente Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich

Der Contourplot in Abbildung 7.20 zeigt die spektrale Entwicklung der Differenzsignale von PR D97N nach Photoanregung. Rot kolorierte Bereiche beschreiben positive Absorptionsänderungen, blaue negative und grüne geben Bereiche ohne Änderung an. Die Zeitachse der Graphik ist bis +1 ps linear skaliert und hiernach logarithmisch.



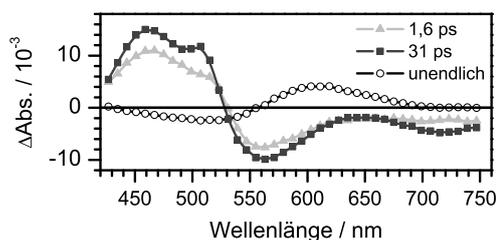
**Abbildung 7.20:** Transiente Absorptionsänderungen von PR D97N in  $\text{D}_2\text{O}$  nach Photoanregung bei 525 nm. Die Hauptbeiträge entsprechen der Absorption des angeregten Zustands, dem Grundzustandsbleichen, der Bildung des Photoproduktes sowie der stimulierten Emission.

Wie schon beim Wildtyp-Protein sind Differenzbanden in vier Regionen erkennbar. Um 480 nm ist eine positive Absorptionsänderung beobachtbar, die auf die Absorption des angeregten Zustands zurückgeführt werden kann. Dieses Signal entsteht in der Kreuzkorrelationszeit und zerfällt auf einer 10 ps Skala, wie anschaulich in den transienten Absorptionsänderungen bei 451 nm in Abbildung 7.21 (links) gezeigt ist. Negative Absorptionssignale sind um 560 nm beobachtbar. Diese können der Depopulation des Grundzustands zugeordnet werden. Bei langen Verzögerungszeiten ist diese Charakteristik von einer positiven Differenzbande überlagert. In Einklang mit vorhergehenden Publikationen [279, 282] wird sie dem Signal des K-Photoprodukts zugeordnet. Die negative Signatur der stimulierten Emission ist oberhalb von 680 nm erkennbar. Wie ein Vergleich der Einzeltransienten in Abbildung 7.21 zeigt, zerfällt dieser Beitrag auf der gleichen Zeitskala wie die Absorption des angeregten Zustands.



**Abbildung 7.21:** Transiente Absorptionsänderungen von PR D97N in D<sub>2</sub>O. Links sind ausgewählte Transienten aus dem Bereich der Absorption des angeregten Zustands (451 nm) und des Grundzustandsbleichens (539 nm) gezeigt, rechts entsprechen die Signale der Bildung des Photoprodukts (603 nm) sowie der stimulierten Emission (739 nm). Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit.

Die transienten Absorptionsdaten ab 0,15 ps wurden anschließend einer globalen Fitanalyse unterzogen. Eine optimale Anpassung benötigt wie auch schon beim Wildtyp-Protein vier Zerfallszeiten. Die kürzeste Zeitkonstante ist hierbei im Bereich der Zeitaufösung und daher von den um den Zeitnullpunkt auftretenden kohärenten Effekten beeinflusst. Sie wird daher nicht weiter diskutiert. Die nachfolgenden Zerfallszeiten  $\tau_2 = 1,6$  ps und  $\tau_3 = 31$  ps weisen große Ähnlichkeiten zu den Zeiten der Anpassung von PR wt bei pD 6,4 auf (Siehe Tabelle 7.5). Starke Beiträge des Zerfalls der Absorption des angeregten Zustands sowie der stimulierten Emission sind erkennbar. Die Zeitkonstanten können daher einem biphasischen Zerfall des angeregten Zustands zugeordnet werden. Die negative Komponente um 560 nm kann dem Rückgang des Grundzustandsbleichens sowie der Photoproduktbildung zugeschrieben werden, sodass durch diese Prozesse zudem einerseits der Ausgangszustand repopuliert und andererseits das Photoprodukt gebildet wird. Das zerfallenssoziierte Spektrum der unendlich-Komponente spiegelt das PR D97N<sub>K</sub>-PR D97N Differenzspektrum wider. Die Signale des depopulierten Grundzustands sowie der positiven K-Photoproduktbande heben sich fast auf, was zu einer sehr geringen Amplitude führt.



**Abbildung 7.22:** Zerfallsspektren von PR D97N in D<sub>2</sub>O im sichtbaren Spektralbereich. Das Spektrum für die erste Zeitkonstante  $\tau_1$  ist dabei nicht gezeigt.

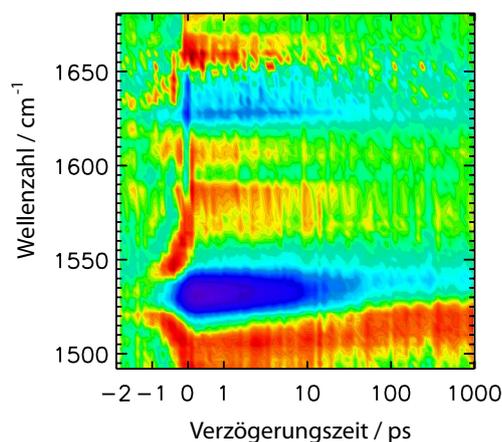
	$\tau_1$ /ps	$\tau_2$ /ps	$\tau_3$ /ps
PR pD 9,2	0,15	0,7	21
PR pD 6,4	0,15	1	25
D97N D <sub>2</sub> O	0,2	1,6	31
D97N H <sub>2</sub> O	0,2	1,4	20
Isotopeneffekt	-	1,2	1,6

**Tabelle 7.5:** Vergleich der Zeitkonstanten der Anpassung der PR wt- und D97N-Daten mit vier Zeitkonstanten. Die unendlich-Komponente ist nicht aufgeführt.

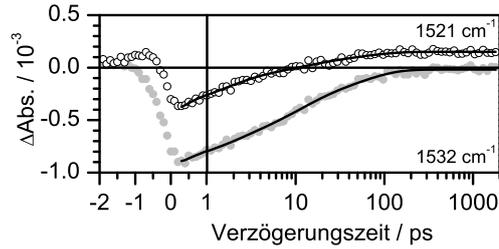
### Transiente Absorptionsmessungen im infraroten Spektralbereich

Transiente Absorptionsmessungen wurden in einem Spektralbereich von  $1490\text{ cm}^{-1}$  bis  $1680\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt. Ein Überblick über die nach Photoanregung stattfindenden Prozesse ist in Abbildung 7.23 gegeben. Die Farbgebung und x-Achsenkalierung ist analog zu der im sichtbaren Spektralbereich. Signale vor dem Zeitnullpunkt sind auf den gestörten freien Induktionszerfall zurückzuführen und Differenzbanden nach  $t=0$  entsprechen photoinduzierten Banden. Um den Zeitnullpunkt sind Effekte wie die Kreuzphasenmodulation zu finden, die sich auf die Wechselwirkung des Anreg- und des Abtastpulses zurückführen lässt.

Im Bereich von  $1490\text{ cm}^{-1}$  und  $1580\text{ cm}^{-1}$  sind die Differenzbanden der C=C-Streckschwingung des Retinals zu beobachten. Das Minimum der Differenzbleichbande findet man im Vergleich zum Wildtyp-Protein leicht verschoben bei  $1530\text{ cm}^{-1}$ . Diese Verschie-



**Abbildung 7.23:** Transiente Absorptionsänderungen von PR D97N in D<sub>2</sub>O nach Anregung bei 525 nm im Bereich von  $1490\text{ cm}^{-1}$  bis  $1680\text{ cm}^{-1}$ . Hauptbeiträge entstammen den photoinduzierten Änderungen der C=C- und C=N-Streckschwingung des Retinalchromophors

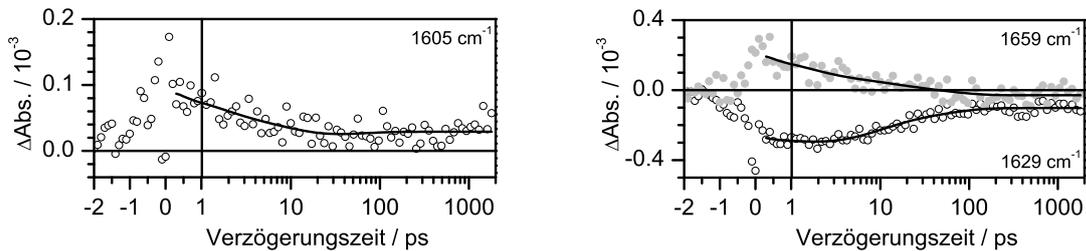


**Abbildung 7.24:** Transiente Absorptionsänderungen von PR D97N in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $1521 \text{ cm}^{-1}$  (○) und  $1532 \text{ cm}^{-1}$  (●). Die Beiträge entsprechen dem Bleichen der C=C-Streckschwingung sowie der Bildung der zugehörigen Produktbande. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit.

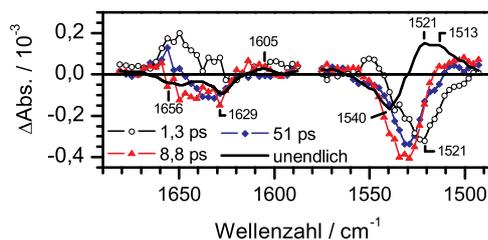
bung ist aber auf der Basis der linearen Abhängigkeit der C=C-Streckschwingung und des Absorptionsmaximums im sichtbaren Spektralbereich [154, 179] erwartungsgemäß.

Wie Abbildung 7.24 zeigt, wird der Grundzustand mit einer Zeitkonstante im Bereich von einigen 10 ps partiell wieder repopuliert. Die positiven Beiträge rotverschoben zur C=C-Bleichbande können der C=C-Streckschwingung von schwingungsangeregten Molekülen im  $S_1$  und  $S_0$  (all-*trans* und 13-*cis*) zugeordnet werden. Das transiente Spektrum zu langen Verzögerungszeiten repräsentiert das Differenzspektrum des K-Intermediats und des Grundzustands und ist als Amplitudenspektrum von  $\tau_\infty$  erhalten (Abbildung 7.26). Die zwei Hauptbanden ((-)  $1540 \text{ cm}^{-1}$ , (+)  $1515 \text{ cm}^{-1}$ ) ähneln stark der spektralen Signatur des  $\text{PR}_K$ -PR-Differenzspektrums bei tiefen Temperaturen [253, 256].

Die stark negative Bande bei  $1629 \text{ cm}^{-1}$  ist die ausgeprägteste Signatur des Abtastbereichs zwischen  $1590 \text{ cm}^{-1}$  und  $1680 \text{ cm}^{-1}$ . Diese strebt mit einer Zeitkonstanten von einigen 10 ps gegen Null und bleibt nach 100 ps auf einem konstanten Offset von  $-100 \mu\text{OD}$  stehen. In Analogie zum Wildtyp-Protein kann diese Bande der C=N-Streckschwingung der Schiffbasen-Verknüpfung zugeordnet werden. Rotverschoben zu der C=N-Bleichbande ist eine in der Amplitude sehr geringe positive Bande beobachtbar, die der selben Dynamik wie die Bleichbande folgt. Das positive Signal zu langen Verzögerungszeiten kann mit hoher Wahrscheinlichkeit der Absorption der C=N-Schwingung des K-Intermediats



**Abbildung 7.25:** Transiente Absorptionsänderungen von PR D97N in  $\text{D}_2\text{O}$ . Die zeitliche Änderung der ausgebleichten C=N-Streckschwingung ( $1629 \text{ cm}^{-1}$ , (○)), einer Produktbande ( $1605 \text{ cm}^{-1}$ , (○)) sowie die Bildung der negativen Amid I-Signatur ( $1659 \text{ cm}^{-1}$ , (●)) sind beschrieben. Die durchgezogenen Linien repräsentieren jeweils den globalen Fit.



**Abbildung 7.26:** Zerfallasoziierte Spektren von PR D97N in D<sub>2</sub>O im infraroten Spektralbereich.

zugeordnet werden. Um  $1660\text{ cm}^{-1}$  ist zudem noch eine zu kurzen Verzögerungszeiten positive Absorptionsänderung zu sehen, die wie Abbildung 7.25 (rechts) zeigt im zeitlichen Verlauf auf ein negatives Differenzsignal zerfällt. Dieses negative Signal wird wie schon für PR wt bei pD 9,2 und 6,4 aufgrund der fehlenden Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls einer negativen Proteinbande (Amid I) zugeschrieben.

Für PR wt wurde eine detaillierte Analyse unter Berücksichtigung verschiedener Zerfallsparameter durchgeführt, und es zeigte sich, dass eine Datenanpassung mit vier Zerfallszeiten ein optimales Ergebnis lieferte (Siehe hierzu Abschnitt 7.2). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Daten wurde für D97N-Mutante auch ein globaler Fit mit vier Zeitkonstanten gewählt. Die Daten wurden hierbei für Verzögerungszeiten  $t_D \geq 0,3\text{ ps}$  angepasst. Die erzielten Resultate gleichen denen des Wildtyp-Proteins (Vgl. Tabelle 7.6) und können daher in diesem Rahmen interpretiert werden.

	$\tau_1/\text{ps}$	$\tau_2/\text{ps}$	$\tau_3/\text{ps}$	$\tau_\infty$
sol. PR pD 9,2	0,6	7	66	unendlich
sol. PR pD 6,4	0,5	6	46	unendlich
D97N pD 7,4	1,3	9	50	unendlich

**Tabelle 7.6:** Vergleich der Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten im infraroten Spektralbereich von PR D97N und PR bei pD 9,2 sowie pD 6,4.

Im Bereich der C=C- und C=N-Streckschwingung ist der zu den Zerfallszeiten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  zugehörige Prozess von schwingungsangeregten Retinalmolekülen dominiert, die über Kühlprozesse in den Schwingungsgrundzustand übergehen. Für das Modellsystem des Retinals mit protonierter Schiffbase in Lösung wurde eine intramolekulare Temperatur von 550 K abgeschätzt [284]. Da der Kühlprozess die spektrale Charakteristik wie auch die Position der Schwingungsbande beeinflusst, können die Daten mit dem benutzten Modell nicht monoexponentiell angepasst werden und es werden daher im vorliegenden Fall zwei Zeitkonstanten zur Beschreibung benötigt. Anzeichen für den im sichtbaren Spektralbereich beobachteten S<sub>1</sub>-S<sub>0</sub>-Übergang sind nicht vorhanden.

Das zerfallasoziierte Spektrum der kürzesten Zeitkonstanten  $\tau_1$  weicht spektral von den Amplitudenspektren von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  ab. Im Bereich der C=C-Streckschwingung ist das Minimum im Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  bei  $1521\text{ cm}^{-1}$  an der Stelle des Photoproduktmaximums im PR D97N<sub>K</sub>-PR D97N-Differenzspektrum zu finden. Zudem

korreliert die positive Absorptionsänderung des Photoproduktspektrums in der Region  $>1510\text{ cm}^{-1}$  mit der negativen Amplitude im Spektrum von  $\tau_1$ . Diese Zeitkonstante muss daher mit der Bildung des Photoproduktes assoziiert sein. Da das zerfallassozierte Spektrum von  $\tau_1$  aber kein exaktes Spiegelbild des Photoproduktspektrums ist, tragen auch hier zusätzlich Beiträge wie die Energieumverteilungsprozesse zum beobachteten Prozess bei. Der Bereich der C=N-Schwingung ist aufgrund des geringeren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses schlechter aufgelöst, sodass eine Interpretation hinsichtlich der Photoproduktbildung der C=N-Schwingung für  $\tau_1$  erschwert ist. Ein signifikanter Beitrag zur Bildung des negativen Proteinsignals um  $1660\text{ cm}^{-1}$ , das mit strukturellen Änderungen des Proteins verbunden ist, kann dennoch sicher angenommen werden.

## Diskussion

Die vorgestellte Studie der Primärdynamik der PR D97N-Mutante stellt eine Erweiterung der bereits durchgeführten Messungen am Wildtyp-Protein dar. Während beim Wildtyp der Protonierungsgrad des primären Protonenakzeptors, Asp-97, über den pH-Wert eingestellt wurde, ist in der untersuchten Mutante die Säuregruppe des Aspartats durch ein Säureamid (Asparagin) ersetzt, wodurch die Seitenkette unabhängig vom pH-Wert ungeladen ist. Da die Messungen an PR- und der D97N-Mutante unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, ist ein direkter Vergleich möglich.

### *Reaktionsdynamik im infraroten Spektralbereich*

Wie ausführlich für PR wt diskutiert, werden auch die transienten Absorptionsdaten der D97N-Mutante am besten durch eine Anpassung mit vier Zeitkonstanten beschrieben. Wie schon für das Wildtyp-Protein beschreibt die erste Zeitkonstante  $\tau_1$  die Bildung der positiven Photoproduktsignaturen in der Region der C=C-Streckschwingung sowie der negativen Proteindifferenzbande um  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Resultaten von Amsden et al. [281], die für PR wt in  $\text{H}_2\text{O}$  zeigen konnten, dass die Isomerisierung des Chromophors und die Antwort des Proteinrückgrats im Bereich der Amid II-Schwingung auf einer Subpikosekunden-Zeitskala stattfinden. Ähnliche Produktbildungs-Beiträge konnten in den zerfallassozierten Spektren von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  nicht gefunden werden, da diese von den Beiträgen der Wärmeableitung des heißen Retinals an die Proteinumgebung dominiert werden. Als nichtexponentieller Prozess, kann dieser Kühlvorgang nicht durch eine einzelne Zerfallszeit angepasst werden, sodass zur korrekten Beschreibung sowohl für PR wt wie auch für die D97N-Mutante zwei Zeitkonstanten benötigt werden.

Ein Vergleich der gewonnenen Zerfallszeiten mit denen des PR wt zeigt, dass die kürzeste Zeitkonstante  $\tau_1$  bei der Mutante einen deutlich höheren Wert aufweist (PR wt 0,6, D97N 1,3), während die nachfolgenden zwei Konstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  im Rahmen des Fehlers identisch sind. Dies zeigt, dass die photoinduzierte Isomerisierung des Retinals in der D97N- Probe deutlich verlangsamt ist, während der Protonierungszustand des primären Protonenakzeptors wenig Einfluss zu haben scheint. Man muss daher davon ausgehen,

dass die Primärreaktion nicht nur durch elektrostatische Wechselwirkungen getrieben wird, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit stark vom Wasserstoffbrückennetzwerk in der Bindetasche abhängt. Allerdings kann die Retinalisomerisierung nicht nur mit dem  $\tau_1$ -Prozess verknüpft sein, sodass hierüber keine endgültigen Schlüsse getroffen werden können. Ferner zeigt die Übereinstimmung der Kühlzeiten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  aller untersuchten Probenformen, dass der beobachtete Kühlprozess nicht von den eingeführten Änderungen in der Retinalbindetasche beeinflusst wird.

Während die transienten Daten im infraroten Spektralbereich keine großen Abweichungen zwischen den PR-Proben gezeigt haben, sind im sichtbaren Spektralbereich signifikante Änderungen feststellbar. Man muss daraus schließen, dass beide Spektralbereiche komplementäre Informationen liefern und nicht unbedingt vergleichbar miteinander sind, wie bereits andere Studien gezeigt haben [284, 285].

### ***Deaktivierung des angeregten Zustands***

Die transienten Absorptionsdaten der solubilisierten PR D97N-Probe zeigen im sichtbaren Spektralbereich eine sehr ähnliche spektrale und zeitliche Charakteristik wie die Daten des Wildtyps bei pD 6,4. Sie können demnach über das für PR wt in H<sub>2</sub>O aufgestellte Reaktionsmodell interpretiert werden [272, 273]. Hiernach spiegeln die beobachteten Absorptionsänderungen direkt die elektronischen Prozesse nach Anregung, d.h. Wellenpaketsbewegungen und den Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand wider. Die Primärreaktion von PR D97N gestaltet sich demnach wie folgt: Nach Photoanregung ist eine ultraschnelle ( $\tau_1 < 0,2$  ps) Bewegung aus dem Franck-Condon-Bereich zu beobachten. Diese ist mit dem Auftreten einer dynamischen Stokesverschiebung, wie sie auch für PR wt [273] oder BR [173, 184] beschrieben wurde, verbunden. Die relaxierte Population im angeregten Zustand zerfällt biexponentiell ( $\tau_2$  und  $\tau_3$ ), wobei ein Teil der Population direkt die konische Durchschneidung nimmt und ein weiterer erst noch eine geringe Barriere überwinden muss. Es werden hierbei sowohl der Ausgangszustand (all-*trans* Retinal) wie auch der K-Photoproduktzustand (all-*cis* Retinal) bevölkert. Am Ende des beobachteten Zeitraums liegt das relaxierte Photoprodukt vor, das durch das PR D97N<sub>K</sub> - PR D97N-Differenzspektrum beschrieben wird.

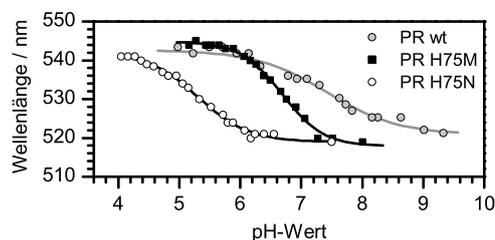
Ein Vergleich der Depopulationszeiten (Tabelle 7.5) des angeregten Zustands von PR D97N in H<sub>2</sub>O [282] und D<sub>2</sub>O zeigt, dass der Zerfall in D<sub>2</sub>O im Mittel um einen Faktor 1,3 langsamer ist als in H<sub>2</sub>O. Auch für das Wildtyp-Protein ist eine auf den H/D-Austausch zurückzuführende Vergrößerung der Zeitkonstanten beobachtet worden. Dieser kinetische Isotopeneffekt lag unter alkalischen Bedingungen bei  $\approx 2,3$  und unter sauren Bedingungen bei  $\approx 1,6$ . Da dieser Effekt hauptsächlich durch den H/D-Austausch der Bindetasche zustande kommen sollte [256, 257], kann aus den Daten geschlossen werden, dass die vorgeschlagenen Wassercluster in der Bindetasche die ultraschnelle Isomerisierung im Alkalischen katalysieren, wohingegen die Anordnung dieser Wassercluster gestört ist und der katalytische Effekt verloren geht, wenn Asp-97 protoniert vorliegt, bzw. durch ein ungeladenes Asparagin ersetzt wurde. Eine Schwächung der Wechselwirkungen der Schiffbase wurde für PR D97N auch über <sup>15</sup>N-Festkörper-NMR festgestellt [250]. Auch

für das archaeale BR konnte eine starke Wasserstoffbrücke zwischen der Schiffbase und einem Wassermolekül (W402) im extrazellulären Halbkanal festgestellt werden. Für die der PR D97N -Mutante analogen Mutation in BR (D85N) zeigte sich, dass das Wechselspiel zwischen den Wassermolekülen, die in den Protonentransfer involviert sind, signifikant gestört ist [286].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der kurzszeitspektroskopischen Studien im sichtbaren und infraroten Spektralbereich gezeigt haben, dass die Kontrolle der Isomerisierungskinetik im PR sehr komplex ist und sowohl von elektrostatischen Wechselwirkungen als auch von der Zusammensetzung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks in der Bindetasche abhängt.

## 7.4 Einfluss des hochkonservierten Histidin-75 auf die Primärdynamik

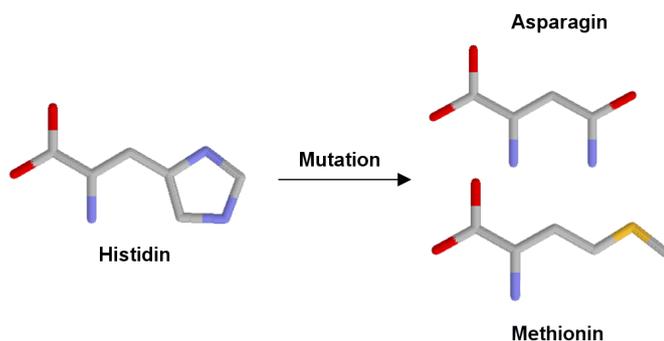
Vorangegangene Studien an PR-Mutanten, bei denen das hochkonservierte His-75 verändert wurde, zeigten den drastischen Einfluss dieser Aminosäure auf den  $pK_a$  des primären Protonenakzeptors [251, 254]. Es wurde daher postuliert, dass im Falle von PR nicht eine einzelne Aminosäure die Position des primären Protonenakzeptors einnimmt, sondern ein Akzeptorkomplex aus Asp-97 und His-75 vorliegt. Das auf die Struktur von BR gestützte Homologiemodell ergibt einen molekulare Abstand zwischen His-75 und Asp-97 von etwa 4 Å, was eine Interaktion der Seitenketten möglich erscheinen lässt.



**Abbildung 7.27:** Titrationskurven von PR H75N und H75M im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Die Titrationsen der Histidin-Mutanten wurden freundlicherweise von Andreas Wörner zur Verfügung gestellt [287].

Gestützt wird diese Annahme durch die Kristallstruktur des verwandten bakteriellen Retinalproteins Xanthorhodopsin (XR) [271]. Diese zeigte eine Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylatgruppe des homologen Aspartats (Asp-96) und dem Imidazolring des auch in diesem Retinalprotein vorhandenen Histidins. Luecke et al. postulierten hieraus einen Aspartat-Histidin-Gegenion-Komplex.

Da die Primärreaktion von Retinalproteinen zum einen von der Elektrostatik, d.h. der Ladungsverteilung im Bereich der Schiffischen Base und des Protonenakzeptors abhängt und zum anderen auch das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in der Retinalbindetasche erhebliche Auswirkungen auf die Isomerisierungsdynamik hat, wurde die sub-ns



**Abbildung 7.28:** Strukturen der für die PR H75N und H75M Mutante entscheidenden Aminosäuren in der Stäbchendarstellung. Die Heteroatome Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel sind in rot, blau bzw. gelb eingefärbt. Wasserstoffatome sowie Mehrfachbindungen sind nicht gezeigt.

Dynamik der PR H75N- und H75M-Mutante in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Mutationen wurden dabei so gewählt, dass im ersten Fall das geladene Histidin durch das ungeladene Asparagin ersetzt wurde (H75N), was Ladungseffekte überprüfen sollte. Die zweite Mutation beruht darauf, dass sich bei BR an der homologen Position 75 ein Methionin befindet (Siehe Abbildung 7.28).

Die erzielten Ergebnisse sind Teil des folgenden Manuskripts, das sich momentan in Vorbereitung befindet und im nächsten Monat eingereicht werden soll:

Fiedler, S.-A., Hempelmann, F., Hölper, S., Köhler, T., Pflieger, N., Verhoefen, M.-K., Wörner, A., Bamberg, E., Wachtveitl, J. und Glaubitz, C., *Elucidation of the role of highly conserved residue His-75 in green proteorhodopsin by solid-state NMR, ultra-fast optical spectroscopy and BLM measurements*, Manuskript in Vorbereitung.

## Experimentelle Vorgehensweise

Detergenz-solubilierte PR H75N- und PR H75M-Proben wurden von der Arbeitsgruppe von Professor Glaubitz zur Verfügung gestellt. Für die transienten Absorptionsmessungen wurden sie in nachfolgend aufgelistete Pufferbedingungen überführt (Tabelle 7.7). Die Messbedingungen wurden dabei anhand der Titrationskurve so gewählt, dass der primäre Protonenakzeptor vollständig protoniert bzw. deprotoniert vorliegt. Eine dritte Messung bei dem pH-Wert durchgeführt, der dem  $pK_a$ -Wert von Asp-97 entspricht.

Die Kurzzeitmessungen im sichtbaren Spektralbereich wurden mit dem in Kapitel 3.4.1 beschriebenen experimentellen Aufbau durchgeführt. Da die Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten der Proben jeweils unter der selben Geometrie betrieben werden sollten, wurden zur Photoanregung die Wellenlängen auf das Absorptionsmaximum der Probe eingestellt, bei der der pH-Wert dem  $pK_a$  entspricht. Im Falle der PR H75N-Mutante war dies eine Wellenlänge von 520 nm, für die PR H75M-Mutante eine Wellenlänge von 530 nm. Die Pulsenergien lagen jeweils bei etwa 30 nJ. Es konnte eine Zeitauflösung von  $<150$  fs erreicht werden.

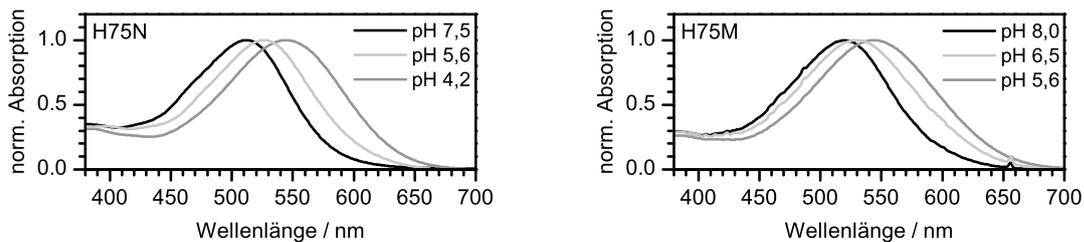
Probe	pH-Wert	Puffer	Detergenz	Salz
H75N	7,5	10 mM MES	0,1% OG	100 mM NaCl
H75N	5,6	10 mM MES	0,1% OG	100 mM NaCl
H75N	4,2	10 mM MES, 10 mM Acetat	0,1% OG	100 mM NaCl
H75M	8,0	10 mM MES	0,1% DDM	100 mM NaCl
H75M	6,5	10 mM MES	0,1% DDM	100 mM NaCl
H75M	5,6	10 mM MES	0,1% DDM	100 mM NaCl

**Tabelle 7.7:** Pufferbedingungen der transienten Absorptionsmessungen an PR H75N und H75M.

Spektral breite Weißlicht-Abtastpulse wurden in einem Saphir-Substrat erzeugt und ein spektraler Bereich von 440 nm bis 750 nm wurde abgedeckt. Anreg- und Abtastpulse waren parallel zueinander polarisiert. Um den Probenaustausch zwischen den Laserschüssen zu gewährleisten wurde die 1 mm-Quarzküvette lateral bewegt. Die optische Dichte der Proben lag bei 0,5. Die transienten Absorptionsdaten wurden aufeinander skaliert, um sie direkt miteinander vergleichen zu können.

### UV-vis-Absorptionsspektroskopie

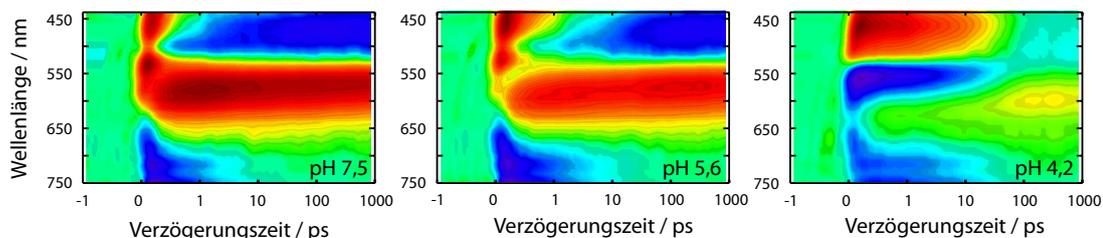
Abbildung 7.29 stellt die Absorptionsspektren der PR H75N- und H75M-Mutante bei den für die Kurzzeitmessungen ausgewählten pH-Werten dar. Wie beim Wildtyp-Protein ist die pH-abhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums auch bei diesen Proben deutlich erkennbar. Wie bereits die Titrationskurven in Abbildung 7.28 zeigen, sind liegt die Chromophor-Absorptionsbanden bei deprotoniertem Protonenakzeptor bei etwa 520 nm und bei protoniertem Asp-97 bei ungefähr 540 nm.



**Abbildung 7.29:** Absorptionsspektren der PR H75N- und PR H75M-Proben bei den für die Kurzzeitmessungen ausgewählten pH-Werten. Die für PR wt charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums ist in den Mutanten erhalten.

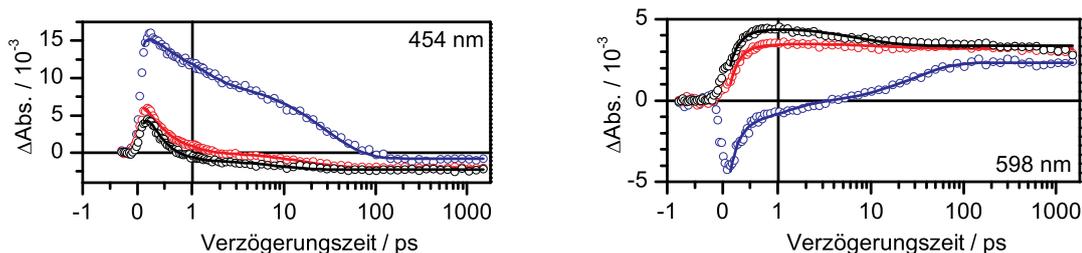
## pH-Abhängigkeit der Primärdynamik von PR H75N

Eine Übersicht der beobachteten Prozesse nach Photoanregung ist in Abbildung 7.30 gegeben. Die 2D-Plots sind farbig kodiert. Rot eingefärbt sind positive Absorptionsänderungen und blau negative Absorptionsänderungen. Ist kein Differenzsignal zu beobachten, so wird dies in grün dargestellt. Die Zeitachse ist bis +1 ps linear skaliert und hiernach logarithmisch.



**Abbildung 7.30:** Contourplots der transienten Absorptionsänderungen von PR H75N bei pH 7,5, 5,6 und 4,2. Die Hauptbeiträge entsprechen der Absorption des angeregten Zustands, dem Grundzustandsbleichen, der Bildung des Photoproduktes sowie der stimulierten Emission.

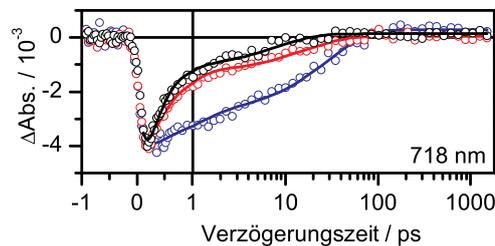
Die transienten Absorptionsänderungen im Spektralbereich von 440 nm bis 650 nm sind im gesamten Zeitbereich von sich überlagernden Banden dominiert, die starke pH-abhängige Änderungen zeigen. Bei pH 7,5 und 5,6 beherrscht die Absorption des angeregten Zustands das beobachtete Differenzsignal zu kurzen Verzögerungszeiten in einem Spektralbereich von 440 nm und 550 nm. Durch den Beitrag des Grundzustandsbleichens ist das Signal in zwei Banden aufgesplittet, die jeweils ihr Zentrum um 450 nm und 530 nm besitzen. Im Gegensatz hierzu ist die rote Flanke der Absorption des angeregten Zustands bei pH 4,2 völlig vom Signal des gebleichten Grundzustands überlagert. Ein weiterer pH-abhängiger Unterschied ist zu langen Verzögerungszeiten beobachtbar. Die charakteristische Signatur der Photoprodukt-Differenzbande besitzt bei pH 7,5 und 5,6 eine hohe Amplitude, wohingegen sich die Banden des Photoprodukts und des Grundzustandsblei-



**Abbildung 7.31:** Transiente Absorptionsänderungen von PR H75N bei pH 4,2 (○), 5,6 (○) und 7,5 (○). Die negativen Absorptionsänderungen entsprechen dem Signal des ausgebleichten Grundzustands. Die positiven Beiträge zeigen zu frühen Verzögerungszeiten die Absorption des angeregten Zustands und zu langen Verzögerungszeiten die Absorption des K-Photoprodukts. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Fit.

chens bei pH 4,2 beinahe auslöschen. Exemplarisch sind in Abbildung 7.31 transiente Absorptionsänderungen im Bereich der Absorption des angeregten Zustands (454 nm) und des Grundzustandsbleichens (598 nm) gezeigt. Spektrale Verschiebungen wurden auch für das Wildtyp-Protein beobachtet [272, 273, 279] (Siehe auch Abschnitt 7.2) und konnten dort zu großen Teilen der Verschiebung der Grundzustandsabsorptionsbande zugeordnet werden. Die bei den His-Mutanten beobachteten spektralen Unterschiede können daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auch hierauf zurückgeführt werden. Neben den Änderungen der Chromophor-Bandenposition sind bei den untersuchten Probenbedingungen auch veränderte Reaktionsdynamiken festzustellen. Der zeitliche Verlauf der Absorption des angeregten Zustands zeigt, dass der Zerfall dieser Bande stark vom pH-Wert beeinflusst wird (Abbildung 7.31 (links)).

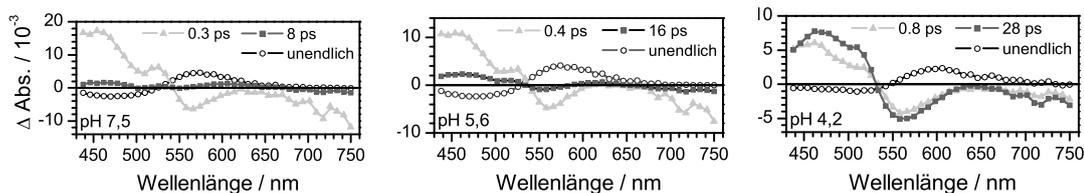
Da die Bande der stimulierten Emission oberhalb 650 nm nicht von anderen Differenzsignaturen überlagert wird, ist sie bestens geeignet um unverfälschte Einsichten in den Zerfall des angeregten Zustands zu bekommen. Eine beispielhafte Transiente ist in Abbildung 7.32 dargestellt. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen für PR wt, ist der Prozess der stimulierten Emission für PR H75N bei pH 4,2 auf einer längeren Zeitskala zu beobachten als für pH  $\approx$  5,6 und pH 7,5. Zusätzlich zeigen die Transienten, dass der angeregte Zustand nicht monoexponentiell entvölkert wird. Neben einem zeitlichen Beitrag im Bereich von 10 ps ist zudem eine sub-Pikosekunden-Zeit sichtbar. Dieser schnelle Beitrag scheint den Zerfall der Bande für pH 7,5 zu dominieren, ist bereits weniger ausgeprägt für pH 5,6 und fast nicht mehr zu identifizieren bei saurem pH-Wert.



**Abbildung 7.32:** Transiente Absorptionsänderungen von PR H75N bei pH 4,2 (○), 5,6 (○) und 7,5 (○) im Bereich der stimulierten Emission. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Fit.

Um die beobachteten Prozesse zu quantifizieren, wurde eine globale Fitanalyse durchgeführt, in der die Daten ab Verzögerungszeiten von +0,15 ps durch Exponentialfunktionen angepasst wurden. Die Daten konnten zufriedenstellend mit vier Exponentialfunktionen beschrieben werden, was mit der Anzahl der Zerfallskonstanten für das Wildtyp-Protein unter unterschiedlichen Bedingungen übereinstimmt [272, 273, 279]. Die kürzeste Zeitkonstante ist hierbei im Bereich der Zeitaufösung und enthält daher Beiträge kohärenter Effekte durch den Anregungs- und Abtastpuls. Sie wird im weiteren daher nicht diskutiert. Die Amplitudenspektren der übrigen Zeitkonstanten sind in Abbildung 7.33 gezeigt.

Die zerfallenssoziierten Spektren der Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  weisen spektral für alle untersuchten pH-Werte die gleiche Charakteristik auf. In beiden Amplitudenspektren sind die Signaturen des Zerfalls des angeregten Zustands (440 nm - 540 nm) sowie



**Abbildung 7.33:** Zerfallsspektren der globalen Anpassung der PR H75N-Daten bei pH 7,5, 5,6 und 4,2. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  ist nicht gezeigt.

der stimulierten Emission ( $>650$  nm) zu beobachten. Das negative Signal zwischen 530 nm und 620 nm kann höchstwahrscheinlich einer Mischung aus Depopulation des Grundzustands und Photoproduktbildung zugeordnet werden. Es kann daher gefolgert werden, dass der angeregte Zustand der H75N-Mutante über zwei Kanäle depopuliert wird, die jeweils sowohl den Ausgangszustand des all-*trans*-Retinals wie auch den 13-*cis*-Photoproduktzustand bevölkern. Das schon in den Einzeltransienten beobachtete Phänomen, dass die zwei Zeitkonstanten abhängig vom pH-Wert unterschiedlich gewichtet sind, spiegelt sich auch in den Amplitudenspektren wider. Die Amplitude von  $\tau_2$  ist im Bereich der Absorption des angeregten Zustands und der stimulierten Emission für die pH 7,5-Probe deutlich über der von  $\tau_3$ , während für die PR H75N-Probe bei pH 4,2 das Gegenteil gilt.

Die beobachteten pH-abhängigen Änderungen finden sich auch in den Werten der Zeitkonstanten wieder. Die Zerfallszeiten des angeregten Zustands von 0,3 ps und 8 ps für die pH 7,5-Probe vergrößern sich bei pH 5,6 auf 0,4 ps und 16 ps und steigen für pH 4,2 auf die Werte 0,8 ps und 28 ps. Ein Vergleich zu den erhaltenen Zeitkonstanten des solubilisierten Wildtyp-Proteins ist in Tabelle 7.8 gegeben.

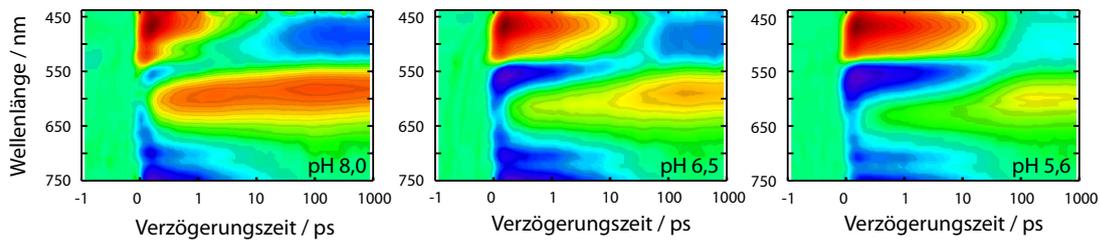
	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_\infty$
PR wt, pH 9,0	0,15	0,28	9,5	unendlich
H75N, pH 7,5	< 0,15	0,3	8	unendlich
H75N, pH 5,6	< 0,15	0,4	16	unendlich
H75N, pH 4,2	< 0,15	0,8	28	unendlich
PR wt, pH 6,0	0,15	1	16,2	unendlich

**Tabelle 7.8:** Zerfallszeiten der globalen Anpassung der PR H75N-Daten. Zum Vergleich sind die erhaltenen Zeitkonstanten der Anpassung der PR wt-Daten bei pH 9,0 und 6,0 gegeben.

Bei allen pH-Werten spiegelt das zerfallsspektren von  $\tau_\infty$  das PR H75N<sub>K</sub> - PR H75N-Differenzspektrum wider. In Übereinstimmung mit dem Contourplot in Abbildung 7.30 heben sich das negative Signal des Grundzustandsbleichens und das positive Signal der K-Absorption fast auf, während mit steigendem pH-Wert höhere Differenzamplituden beobachtet werden.

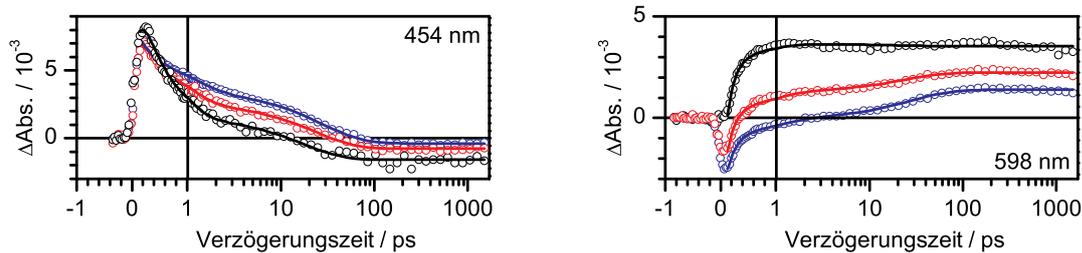
### pH-Abhängigkeit der Primärdynamik von PR H75M

Die Untersuchungen an der PR H75M-Mutante wurden nach dem selben Schema wie die Messungen an der PR H75N-Mutante durchgeführt. Die Dynamik nach Photoanregung wurde bei pH-Werten, an denen der primäre Protonenakzeptor protoniert (pH 5,6) und deprotoniert (pH 8,0) vorliegt, sowie in der Nähe des  $pK_a$ -Werts untersucht. Wie für die H75N-Mutante sind die Spektren entsprechend ihrer Konzentration skaliert. Eine Übersicht über die gewonnenen Ergebnisse ist in Abbildung 7.34 zu sehen. Die 2D-Graphiken folgen dem gleichen Farbschema und der gleichen Achsenskalierung wie Abbildung 7.30.

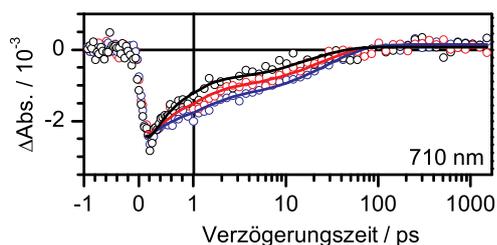


**Abbildung 7.34:** Contourplots der transienten Absorptionsänderungen von PR H75M bei pH 8,0, 6,5 und 5,6. Die Hauptbeiträge entsprechen der Absorption des angeregten Zustands, dem Grundzustandsbleichen, der Bildung des Photoproduktes sowie der stimulierten Emission.

Die transienten Spektren der pH-Werte, bei denen Asp-97 protoniert bzw. deprotoniert vorliegt, stimmen in den Grundzügen mit den analogen Spektren von PR H75N überein. Lediglich das Spektrum am  $pK_a$ -Wert hat im Fall der H75M-Mutante eine höhere Ähnlichkeit mit dem der sauren Spezies, während das analoge Spektrum der H75N-Mutante mehr Gemeinsamkeiten mit den transienten Absorptionsänderungen der alkalischen Spezies aufweist. Weitere Unterschiede werden wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Anregungswellenlängen und kleinen spektralen Verschiebungen hervorgerufen. Die durch die Verschiebung der Retinalabsorptionsbande hervorgerufenen spektralen Unterschiede



**Abbildung 7.35:** Transiente Absorptionsänderungen von PR H75M bei pH 5,6 ( $\square$ ), 6,5 ( $\triangle$ ) und 8,0 ( $\circ$ ). Die positiven Beiträge zeigen zu frühen Verzögerungszeiten die Absorption des angeregten Zustands und zu langen Verzögerungszeiten die Absorption des K-Photoproduktes. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Fit.



**Abbildung 7.36:** Transiente Absorptionsänderungen von PR H75M bei pH 5,6 (○), 6,5 (○) und 8,0 (○) im Bereich der stimulierten Emission. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den Fit.

im Bereich der Absorption des angeregten Zustands und der Grundzustandsbleichbande sind auch in den transienten Spektren der H75M-Mutante zu erkennen. Wie Abbildung 7.35 verdeutlicht, ändert sich die Dynamik für diese Banden pH-abhängig. Hierbei nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit von der Probe bei pH 8,0 bis hin zur Probe bei pH 5,6 ab. Da sich die Banden im Spektralbereich von 440 nm bis 650 nm stark überlagern, ist es schwierig aus den Einzeltransienten Informationen über den Zerfall des angeregten Zustands zu erlangen. Dies trifft jedoch nicht auf die transienten Absorptionsänderungen im Bereich der stimulierten Emission zu. Abbildung 7.36 zeigt eine exemplarisch gewählte Transiente bei 710 nm. Es ist deutlich eine pH-abhängige Dynamik erkennbar, die aber bei PR H75M nicht so stark ausgeprägt ist, wie bei PR H75N oder dem Wildtyp-Protein.

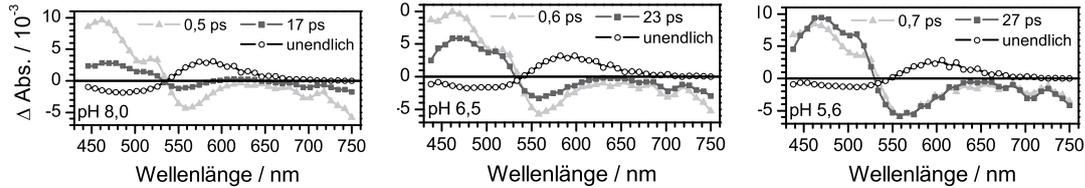
Zur weiteren Auswertung der Daten wurde eine globale Fitanalyse für Verzögerungszeiten größer 0,15 ps durchgeführt. Die transienten Daten konnten zufriedenstellend mit vier Zeitkonstanten angepasst werden. Die erste Zerfallskomponente  $\tau_1$  liegt hierbei im Bereich der Zeitauflösung und wird daher nicht weiter betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.9 aufgelistet.

	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_\infty$
PR wt, pH 9,0	0,15	0,28	9,5	unendlich
H75M, pH 8,0	< 0,15	0,5	17	unendlich
H75M, pH 6,5	< 0,15	0,6	23	unendlich
H75M, pH 5,6	< 0,15	0,7	27	unendlich
PR wt, pH 6,0	0,15	1	16,2	unendlich

**Tabelle 7.9:** Zerfallszeiten der globalen Anpassung der PR H75M-Daten. Zum Vergleich sind die erhaltenen Zeitkonstanten der Anpassung der transienten Absorptionsmessungen des Wildtyp-Proteins bei pH 9,0 und 6,0 gegeben.

Die Zuordnung der Zeitkonstanten erfolgte mit Hilfe der zerfallassozierten Spektren, die in Abbildung 7.37 dargestellt sind. Die den Zerfallszeiten unterliegenden Prozesse konnten analog zu PR wt und PR H75N zugeordnet werden.  $\tau_2$  und  $\tau_3$  spiegeln demnach einen biexponentiellen Zerfall des angeregten Zustands wider, bei dem neben dem Photoprodukt auch der Ausgangszustand wieder bevölkert wird. Die Tatsache, dass sich die Amplitude

der transienten Absorptionsänderungen von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  im Bereich der Absorption des angeregten Zustands und der stimulierten Emission pH-abhängig ändert, wird darauf zurückgeführt, dass die einzelnen Zerfallskanäle je nach pH-Wert unterschiedlich gewichtet sind. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_\infty$  entspricht dem Differenzspektrum nach 1,5 ns. Man erkennt, dass das PR H75M<sub>K</sub>-PR H75M-Differenzspektrum durch die Verschiebung der Grundzustandsabsorptionsbande eine vom pH-Wert abhängige Amplitude besitzt.



**Abbildung 7.37:** Zerfallasoziierte Spektren von PR H75M bei pH 8,0, 6,5 und 5,6. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  ist nicht gezeigt.

## Diskussion

Die durchgeführten Ultrakurzzeituntersuchungen im sichtbaren Spektralbereich zeigten, dass die pH-Abhängigkeit der Primärdynamik der PR H75N- und H75M-Mutanten sehr ähnlich zu der beobachteten Abhängigkeit des Wildtyp-Proteins sind. Direkt nach Photoanregung ist eine sehr schnelle Dynamik im Bereich von 100 fs feststellbar, die aber für die gezeigten Messungen im Bereich der Zeitaufösung liegt. In Anlehnung an frühere Publikationen über PR [273] und andere Retinalproteine [173, 184] kann dieser Prozess am wahrscheinlichsten einer ultraschnellen Wellenpacketsbewegung aus der Franck-Condon-Region zugeordnet werden. Im Falle von BR wird angenommen, dass die Bewegung über die eine Streckschwingung der konjugierten Kohlenstoffkette stattfindet, der sich die Torsion um die C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub>-Bindung anschließt [195]. Der biexponentielle Zerfall des angeregten Zustands wurde über einen sich aufteilenden Deaktivierungspfad erklärt [272, 273], bei dem ein Teil der Population direkt durch die konische Durchschneidung läuft, während der andere über ein lokales Minimum der angeregten Zustandsfläche den Grundzustand erreicht.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für PR wt und die D97N-Mutante hat die Variation des pH-Werts zwei Auswirkungen auf die biphasische Deaktivierung des angeregten Zustands. Zum einen ändern sich die Reaktionsraten mit dem pH-Wert der Probe. Eine Probe mit deprotoniertem primären Protonenakzeptor Asp-97 (PR wt pH 9,0, PR H75N bei pH 7,5, H75M bei pH 8,0) zeigt im allgemeinen eine schnellere Entvölkerung des S<sub>1</sub>-Zustands verglichen mit Proben, bei denen Asp-97 protoniert (PR wt pH 6,0, PR H75N pH 4,2, PR H75M pH 5,6) oder wie im Falle von PR D97N durch Mutation ungeladen vorliegt. Die hier gezeigten Messungen an den Histidin-Mutanten zeigen zudem, dass die Proben, bei denen der pH-Wert gleich dem pK<sub>a</sub> von Asp-97 ist, eine zwischen den Extremwerten liegende zeitliche Charakteristik aufweisen (Siehe

Tabellen 7.8 und 7.9). Den zweiten beobachteten pH-Effekt kann man am besten in den zerfallassozierten Spektren erkennen (Abbildungen 7.33 und 7.37). Im Bereich der Absorption des angeregten Zustands sowie der stimulierten Emission ändern sich die Amplituden der Zerfallsspektren der Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  mit dem pH-Wert. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass der schnelle Deaktivierungspfad für Proben mit deprotoniertem Gegenion Asp-97 dominierend ist, während der langsamere Reaktionskanal für Proben mit protoniertem Asp-97 bevorzugt wird.

Die aufgezeigten Gemeinsamkeiten der unterschiedlichen PR Proben zeigen, dass obgleich sich die spektrale Signatur sowie der  $pK_a$ -Wert des primären Protonenakzeptors in den H75N- und H75M-Mutanten ändern, die generelle Isomerisierungscharakteristik erhalten bleibt. Die erhaltenen Zeitkonstanten der PR H75N-Mutante weisen eine hohe Ähnlichkeit zu denen des Wildtyp-Protein auf. Man kann daher davon ausgehen, dass die elektrostatischen und sterischen Eigenschaften der Bindetasche wie auch das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk erhalten bleiben. Dies stimmt mit NMR-Studien überein, die zeigen, dass die Umgebung der Schiffbase nicht von den Mutationen beeinflusst wird [251]. Im Gegensatz hierzu sind Abweichungen für die PR H75M-Mutante feststellbar. Die erhaltenen Zeitkonstanten implizieren, dass die pH-Abhängigkeit weniger ausgeprägt ist als im Wildtyp-Protein oder in der H75N-Mutante. Dies spricht dafür, dass die unpolare Methionin-Seitenkette eine höhere Hydrophobizität in der Umgebung der Schiffbase erzeugt, die zusätzlich über das Schwefelzentrum die Elektrostatik der Retinalbindetasche und damit die Isomerisierung beeinflussen könnte, jedoch weniger Einfluss auf den  $pK_a$  des Gegenion-Komplexes hat.

## 7.5 Tieftemperaturcharakterisierung des Proteorhodopsin-Photozyklus im Sichtbaren

Der Protonenpumpvorgang von PR wurde in den letzten 10 Jahren an rekonstituierten Proben wie auch in zellulären Systemen ausführlich untersucht. Da nahezu alle bei BR am Pumpmechanismus beteiligten Aminosäuren konserviert sind, wurde für PR ein ähnlicher Mechanismus erwartet. Unter alkalischen Bedingungen ist dies in erster Näherung auch der Fall. Wie bei BR konnte hier die nach außen gerichtete Protonenfreisetzung beobachtet werden [30, 242]. Das Bild ändert sich jedoch bei pH-Werten unterhalb des ungewöhnlich hohen  $pK_a$ -Werts des primären Protonenakzeptors ( $\approx 7,5$ ). Friedrich et al. [30] zeigten in Photostrommessungen, dass sich die Pumprichtung umkehrt und nun Protonen in Richtung des Cytoplasmas gepumpt werden. Die Richtigkeit dieser Messungen wurde aber von Dioumaev et al. [242] angezweifelt, da sie nicht an orientierten PR-Proben wiederholt werden konnte. Hierzu kam zusätzlich noch das Problem, dass das M-Intermediat, welches im BR Photozyklus mit der Änderung der Zugänglichkeit des Proteins verknüpft ist, nicht in kinetischen Photozyklusmessungen identifiziert werden konnte [30, 242, 277]. Die nachfolgenden Tieftemperaturuntersuchungen nehmen sich der Fragestellung an, ob das M-Intermediat Teil des sauren PR-Photozyklus ist.

Die erzielten Ergebnisse sind bereits in nachfolgendem Artikel veröffentlicht:

Lörinczi, E., Verhoefen, M.-K., Wachtveitl, J., Woerner, A.C., Glaubitz, C., Engelhard, M., Bamberg, E. und Friedrich, T. *Voltage- and pH-dependent Changes in Vectoriality of Photocurrents Mediated by Wild-type and Mutant Proteorhodopsins upon Expression in Xenopus Oocytes*. JMB (2009), **393**: 320-341.

### Experimentelle Vorgehensweise

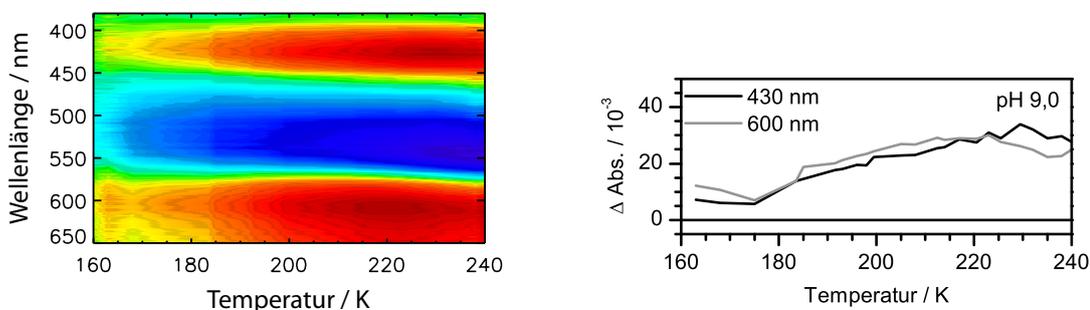
Aufgereinigte PR wt-Proben wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. C. Glaubitz, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Zur Rekonsitution wurde das PR zu detergentsolubilisierten Lipiden (5 mg Lipid/ml, 2% Oktylglykosid, 5:1 Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin / Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerol) gegeben und gegen das 500-fache Volumen Tris-Puffer dialysiert. Die Messungen wurden in 20mM Tris-Puffer, 500 mM NaCl, pH 9, bzw. 20 mM Citratpuffer, pH 4, durchgeführt. Der Austausch des Puffers wurde über Zentrifugationsfiltrierung realisiert.

Die Tieftemperaturmessungen wurden an Proteinfilmern durchgeführt. Hierzu wurde ein Proteinpellet ( $\approx 50 \mu\text{g}$  Protein) auf eine  $\text{CaF}_2$ -Scheibe aufgebracht und unter Normalbedingungen einige Minuten getrocknet. Durch Aufpressen einer zweiten Scheibe erhält man einen homogenen Proteinfilm. Der Hydratationsgrad wurde über FTIR-Absorptionsspektren verifiziert. Die präparierten Filme wiesen ein Wasser/Amid I- zu Amid II-Bandenverhältnis von etwa 2 auf. Da die Bandenposition der Chromophorabsorption im sichtbaren Spektralbereich den Protonierungsgrad des primären Protonenakzeptors widerspiegelt, konnte der pH-Wert der Proteinfilme hierüber überwacht werden.

Tieftemperaturspektren wurden analog zu bereits veröffentlichten Protokollen für BR [159] durchgeführt. Die Differenzspektren wurden mit einem Specord S100 Einstrahlphotometer (Analytik Jena) in einem Spektralbereich von 380 nm bis 650 nm durchgeführt. Der Proteinfilm wurde nach etwa 20-minütiger Gleichgewichtseinstellung bei Raumtemperatur in dem in Kapitel 5.1 beschriebenen Eigenbau-Kryostaten ohne Messlicht auf etwa 150 K schockgefroren. Die Temperatur wurde hierbei über ein Pt-100-Widerstandsthermometer gemessen. Bei dieser Temperatur wurde ein Spektrum der Probe  $\text{PR}_{\text{dunkel}}$  aufgenommen, das für die spätere Berechnung der Differenzspektren als Referenz dient. Die Probe wurde anschließend durch eine 500 W-Hg-Xe-Lampe (LC4, Hamamatsu) in Kombination mit einer Kurzpass-Langpass-Filterkombination (Thorlabs) bei etwa  $525 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$  für 60 s belichtet. Während des Aufwärmens (2 K/min) wurden alle 3 bis 4 K sogenannte  $\text{PR}_{\text{belichtet}}$ -Spektren gemessen. Aufgrund der unterschiedlichen Streubeiträge bei den verschiedenen Temperaturen mussten die einzelnen Spektren basislinienkorrigiert werden, bevor die Differenzspektren  $\text{PR}_{\text{belichtet}} - \text{PR}_{\text{dunkel}}$  gebildet wurden. Durch die hohe Aufheizrate sind dies keine Gleichgewichtsspektren.

### Temperaturrampe bei pH 9,0

Abbildung 7.38 gibt einen Überblick über die lichtinduzierten temperaturabhängigen Differenzspektren von PR bei pH 9,0. In rot sind photo- bzw. temperaturinduzierte positive Absorptionsänderungen koloriert, in blau negative Absorptionsänderungen. Die Abbildung zeigt Differenzbanden in drei spektralen Regionen. Um 520 nm ist im gesamten beobachteten Temperaturbereich ein stark negativer Beitrag erkennbar. Er lässt sich auf die Depopulation der Grundzustands zurückführen. Rotverschoben hierzu ist eine positive Differenzbande erkennbar, die bis etwa 170 K leicht abfällt. Nachfolgend wächst das positive Absorptionssignal mit zunehmender Temperatur und erreicht sein Maximum bei etwa 220 K. Zeitgleich mit diesem Anstieg beobachtet man um 430 nm eine positive Absorptionsänderung mit sehr ähnlicher Temperaturcharakteristik. Die deutliche Differenzbandenstruktur bei 240 K zeigt, dass der Photozyklus bei dieser Temperatur noch nicht abgeschlossen ist.

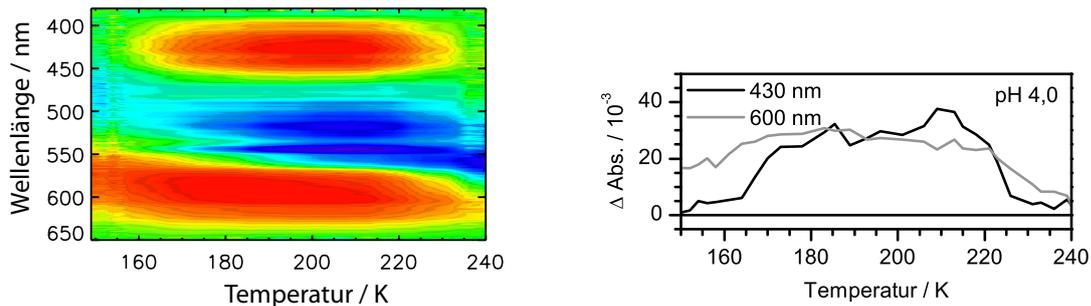


**Abbildung 7.38:** Übersicht über die temperaturabhängigen Differenzsignale von PR bei pH 9,0 im sichtbaren Spektralbereich. Die Einzelkanal-Absorptionsänderungen bei 430 nm und 600 nm sind in der rechten Abbildung gegeben.

Beide positiven Differenzbanden werden der Absorption von Photoprodukten des PR-Photozyklus zugeschrieben. Ein Vergleich der Bandenpositionen mit der in der Literatur beschriebenen spektralen Charakteristik der Intermediate ergibt, dass die Absorption um 430 nm dem M-Intermediat des Photozyklus zugeordnet werden kann. Eine eindeutige Bandenzuordnung kann im Bereich der rotverschobenen Produktbande um 600 nm nicht erfolgen, da in diesem Spektralbereich sowohl das im Reaktionszyklus direkt nach der Isomerisierung auftretende K-Intermediat, als auch die später auftretenden, hier PR' und PR'' genannten Intermediate absorbieren. Der bei tiefen Temperaturen leicht abfallende Verlauf der um 600 nm absorbierenden Bande kann aber wahrscheinlich dem Zerfall des K-Intermediats zugeordnet werden, während die anschließende Charakteristik ab 180 K einem oder mehreren späten Photozyklusintermediaten zuzuordnen ist. Es ist jedoch nicht möglich zwischen diesen späten Intermediaten zu differenzieren.

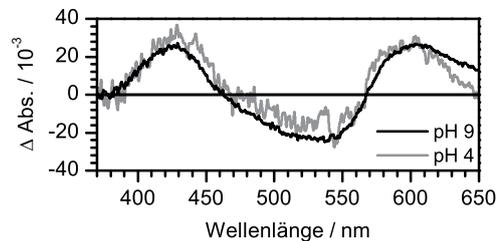
### Temperaturrampe bei pH 4,0

Abbildung 7.39 zeigt die temperaturabhängigen Absorptionsänderungen von PR wt bei pH 4,0 nach Anregung bei 525 nm. Im Gegensatz zu kinetischen Messungen sind in den Tieftemperaturspektren bei pH 4,0 wie bei pH 9,0 Differenzbanden in drei verschiedenen spektralen Regionen sichtbar ((+)430 nm, (-)540 nm, (+)600 nm). Dennoch sind spektrale und temperaturabhängige Unterschiede zwischen den Differenzspektren bei pH 9,0 und pH 4,0 erkennbar.



**Abbildung 7.39:** Übersicht über die temperaturabhängigen Differenzsignale von PR bei pH 4,0 im sichtbaren Spektralbereich. Die Einzelkanal-Absorptionsänderungen bei 430 nm und 600 nm sind in der rechten Abbildung gegeben.

Um 600 nm ist über den gesamten beobachteten Temperaturverlauf ein positives Absorptionssignal zu erkennen. Dieses steigt bei Temperaturen um 170 K leicht an und nimmt bei Temperaturen von  $>220$  K wieder ab. Unterhalb von 170 K kann diese Charakteristik dem K-Intermediat zugeschrieben werden, mit wachsender Temperatur sollte sich aber das Gleichgewicht auf die späten roten Intermediate PR' und PR'' verlagern. Im Unterschied zu den Differenzspektren bei pH 9,0 schiebt die negative Grundzustandsbleichbande um 540 nm mit wachsender Temperatur zu größeren Wellenlängen. Dies kann einer stärkeren spektralen Überlagerung des frühen K-Intermediats und der Grundzustandsabsorptionsbande bei sauren pH-Werten zugeschrieben werden (Siehe hierzu auch Abschnitt 7.2). Mit dem beobachteten Anstieg der Bande bei 600 nm ist auch im blauen Flügel des Spektrums die Bildung einer Photoproduktbande bei 430 nm zu



**Abbildung 7.40:** Vergleich der bei 220 K aufgenommenen, Differenzsignale von PR unter sauren (pH 4,0) und alkalischen (9,0) Bedingungen. Die Spektren sind nicht aufeinander skaliert.

sehen. Sie besitzt in einem Temperaturbereich von 170 K bis 220 K eine nahezu konstante Amplitude und zerfällt bei Temperaturen oberhalb 230 K. Wie die IR-Differenzspektren von PR bei 77 K gezeigt haben (Siehe Seite 119), weist der Chromophor bei pH 5 eine korrekte all-*trans* nach 13-*cis* Isomerisierung auf, die auch für pH 4,0 angenommen wird. Es wird daher ausgeschlossen, dass sich die beobachtete Bande bei 430 nm auf die Bildung der von Imasheva et al. berichteten 9-*cis*-Spezies zurückführen lässt [258, 259]. Die Bande kann daher aufgrund des Absorptionsmaximum von etwa 430 nm dem M-Intermediat zugeordnet werden. Da, wie Abbildung 7.40 zeigt, die Amplitude dieser Bande vergleichbar mit der der rotverschobenen Intermediate ist, kann die beobachtete Charakteristik auch nicht auf den bei pH 4,0 sehr geringen Anteil ( $\ll 1\%$ ) von PR-Proteinen in der alkalischen Form zurückgeführt werden.

## Diskussion

Die temperaturabhängigen Differenzspektren von PR zeigen für pH 9,0 und pH 4,0 eine charakteristische Abfolge von Intermediaten. Unter alkalischen Bedingungen sind drei deutliche spektrale Beiträge beobachtbar. Die bei tiefen Temperaturen beobachtete Absorption um 600 nm wird dem K-Intermediat zugeordnet. Ab Temperaturen von etwa 180 K ist der Aufbau einer blau-verschobenen Absorptionsbande um 430 nm sichtbar, die der deprotonierten Schiffbasen-Konfiguration des M-Intermediats zugeordnet wird. Hiermit einher geht die Bildung einer weiteren Bande um 600 nm, die der Absorption eines oder mehrerer später  $BR_N$  bzw.  $BR_O$ -ähnlicher Intermediate (hier PR' und PR'' genannt) zugeordnet werden kann. Die wirkliche Anzahl an spektral stillen Intermediaten kann aber mit der verwendeten Technik nicht festgestellt werden. Die Übergangstemperatur des K-Intermediats in ein Gleichgewicht aus  $M \rightleftharpoons PR'/PR''$  ist in guter Übereinstimmung mit der Temperatur des Glasübergangs in Proteinfilmern [288]. Es sollten also ab dieser Temperatur die für den Fortgang des Photozyklus benötigten konformationellen Änderungen vonstatten gehen können. Das ausgeprägte Differenzspektrum bei 240 K zeigt, dass der Photozyklus bei dieser Temperatur noch nicht beendet ist.

Unter sauren Bedingungen (pH 4,0) konnten die gleichen Intermediate wie auch bei pH 9,0 beobachtet werden, jedoch änderte sich die Temperaturcharakteristik signifikant. Direkt nach Anregung ist eine positive Absorptionsänderung um 600 nm erkennbar. Ab etwa 170 K liegt ein Gleichgewicht aus einer bei 430 nm absorbierenden Spezies und einem Photoprodukt, das um 600 nm absorbiert, vor. Das frühe rotverschobene Photoprodukt wird dem K-Intermediat zugeordnet. Mit steigender Temperatur wird die Bande einem  $BR_N$ - bzw.  $BR_O$ -ähnlichen Intermediat, oder einem Gleichgewicht aus beiden, hier mit PR' bzw. PR'' bezeichnet, zugeschrieben. Die blau-verschobene Spezies kann aus oben genannten Gründen nur dem M-Intermediat zugeordnet werden. Am Ende der beobachteten Temperaturrampe ist bei pH 4,0 ein geringes Differenzsignal sichtbar, das aus Beiträgen des Grundzustandsbleichens und der Absorption der rot verschobenen Photoprodukte besteht. Das M-Intermediat ist entsprechend nur bei Temperaturen zwischen 170 K und 230 K zu beobachten. Dieser drastische Unterschied zu den Messungen

bei pH 9,0 zeigt, dass die Reaktionsbarrieren bei pH 9,0 und pH 4,0 auch am Ende des Photozyklus deutlich voneinander abweichen.

Das gewonnene Ergebnis scheint zu überraschen, da das M-Intermediat in kinetischen Messungen bei Raumtemperatur nicht beobachtet werden konnte. Die Ursache für das Auftreten dieser Spezies in den durchgeführten Tieftemperaturmessungen ist wahrscheinlich kinetischer Natur. Unter Raumtemperaturbedingungen würde eine langsame Schiffbasen-Deprotonierungsreaktion in Kombination mit einer sehr schnellen Reprotonierungsreaktion zu einer sehr geringen Population des M-Intermediats führen. Das transiente Signal wäre daher wahrscheinlich nicht ausreichend groß, um es in kinetischen Messungen zu identifizieren. Dass dieses Signal in Tieftemperaturmessungen beobachtet wird, kann darauf zurückgeführt werden, dass sich einerseits die Reaktionsraten mit der Temperatur verändern (vgl. Kapitel 4.3), andererseits werden sich sicherlich auch die Reaktionskoordinaten ändern. Gerade Moden, die mit großen Strukturänderungen in Verbindung stehen, wie die mit dem M-Intermediat in Verbindung stehende Umkehr der Zugänglichkeit des Proteins im Switch-Prozess, werden deutlich durch die tiefen Temperaturen beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Studie validieren somit die von Friedrich et al. [30] und Lörinczi et al. [31] beobachtete Umkehr der Pumprichtung in dem Sinne, als dass sie das für den Pumpmechanismus wichtige M-Intermediat zeigen. Die durchgeführten Tieftemperaturmessungen sind daher richtungsweisend für die Erforschung der Funktion von PR.

## 7.6 Tieftemperaturcharakterisierung des Proteorhodopsin-Photozyklus im Infraroten

Da die vorangegangenen Studien im sichtbaren Spektralbereich gezeigt haben, dass das M-Intermediat des sauren PR-Photozyklus bei tiefen Temperaturen nachgewiesen werden kann, wurden nachfolgend Untersuchungen mit der strukturell sensitiven Methode der Infrarotspektroskopie durchgeführt. Man erhoffte sich hierdurch über die Protonierungs- und Deprotonierungssignaturen im Bereich der Carboxylschwingungen ( $> 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) mechanistische Einblicke in den Protonentransportweg zu bekommen. Die charakteristischen Differenzsignale im Bereich der Amid I- und -II-Schwingung sollten darüber hinaus Informationen über die mit dem Pumpvorgang verbundenen Helixbewegungen geben. Die erzielten Ergebnisse sind in nachfolgende Publikation mit eingeflossen. Darüber hinaus befindet sich ein weiteres Manuskript in Vorbereitung.

Schäfer, G., Shastri S., Verhoefen, M.-K., Vogel, V., Glaubitz, C., Wachtveitl, J. und Mäntele, W., *Characterizing structure and photocycle of PR 2D crystals with CD and FTIR-spectroscopy* Photochem. Photobiol. (2009), **85**: 529-534.

Verhoefen, M.-K., Schäfer, G., Shastri, S., Weber, I., Glaubitz, C., Mäntele, W. und Wachtveitl, J., *Low temperature FTIR spectroscopy reveals new insights on the pH-dependent proton pathway of Proteorhodopsin*, in Vorbereitung.

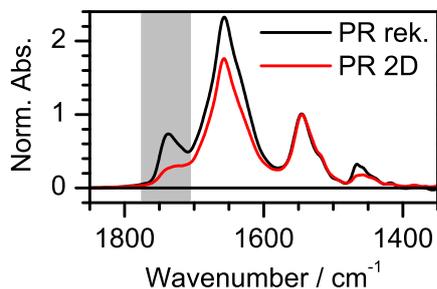
## Experimentelle Vorgehensweise

In einem ersten Schritt wurden unterschiedliche Probenformen (in Phospholipiden rekonstituiertes PR ( $PR_{rek}$ ) und 2D-kristallisiertes PR ( $PR_{2D}$ )) getestet. Nachfolgend wurde der bei Raumtemperatur gut charakterisierte Photozyklus bei pH 9,0 untersucht. Die Geometrie der Kryostathalterung sowie der Aufbau der Belichtungseinheit wurde hierbei optimiert, sodass für die Analyse des Photozyklus bei saurem pH-Wert ein optimales Messprotokoll benutzt werden konnte. Es zeigte sich, dass eine Belichtungszeit von 60 s ein zufriedenstellendes Differenzsignal ergibt. Das erste Grundzustandsintermediat K konnte am besten über statische Differenzspektren bei 77 K charakterisiert werden. Das Auftreten der nachfolgenden Intermediate wurde hingegen in den Differenzbanden von zeitaufgelösten RapidScan-Messungen bei einer vorgegebenen Temperatur beobachtet. Dies hat den weiteren Vorteil, dass Übergänge zwischen den Intermediaten kinetisch erfasst werden können. Um eine Vergleichbarkeit der Photozyklen bei saurem und alkalischem pH-Wert zu erzielen, wurden alle Messungen in dem für die IR-Spektroskopie geeigneten Puffer Natriumphosphat (100 mM Phosphat, 100 mM NaCl) durchgeführt. Der volle Pufferbereich wurde dabei ausgenutzt und bei den Extremwerten von pH 5,1 und 9,0 gemessen. Abschließend wurde noch der Einfluss von kleinen pH-Wert-Änderungen im Bereich von 0,5 Einheiten untersucht.

## Vergleich der Probenform

Frühere Studien des archaealen Retinalproteins BR haben bereits gezeigt, dass neben dem Wassergehalt sowohl die Art als auch der Anteil des Lipids einen erheblichen Einfluss auf den Photozyklus hat [289–292]. Die Messungen wurden daher mit hydratisierten Proteinfilmern durchgeführt, bei denen immer ungefähr ein Amid I-/Wasser zu Amid II-Bandenverhältnis von 2:1 eingestellt wurde (Siehe Abbildung 7.41).

Um den Einfluss des Lipids auf den Photozyklus festzustellen, wurden als erstes vergleichende Studien mit rekonstituiertem und 2D-kristallisiertem PR durchgeführt. In der rekonstituierten Probenform liegt das Protein in Dimyristoyl-Vesikeln vor. Das Absorptionsspektrum der 2D-kristallisierten Filmprobe weist hingegen einen wesentlich geringeren



**Abbildung 7.41:** Vergleich der IR-Absorptionsspektren von rekonstituiertem und 2D-kristallisiertem Proteorhodopsin bei pH 5,1. Die präparationsabhängigen Unterschiede sind deutlich in der grau unterlegten Bande um  $1750\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten.

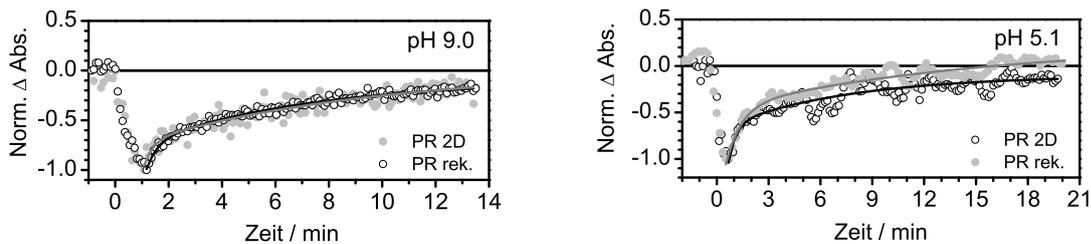
Probenform	$\tau_1$ / min	$\tau_2$ / min
PR <sub>rek</sub> pH 9,0	< 1	7
PR <sub>2D</sub> pH 9,0	< 1	8
PR <sub>rek</sub> pH 5,1	< 1	6
PR <sub>2D</sub> pH 5,1	< 1	15

**Tabelle 7.10:** Vergleich der Zeitkonstanten der Retinalreisomerisierung bei  $1538\text{cm}^{-1}$  für PR<sub>rek</sub> und PR<sub>2D</sub> bei pH 5,1 und 237 K sowie pH 9,0 und 257 K.

Anteil an Lipiden (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine (DOPC)) auf (grau markierter Bereich um  $1730\text{cm}^{-1}$  in Abbildung 7.41). Das Protein-zu-Lipid-Verhältnis liegt hier bei etwa 0,25 (w/w) [249].

Abbildung 7.42 vergleicht die Reisomerisierungskinetik der C=C-Streckschwingung bei  $1538\text{cm}^{-1}$ . Für pH 9,0 konnte kein Einfluss der Probenpräparation festgestellt werden. Ein biexponentieller Fit der Daten lieferte im Rahmen des Fehlers identische Zeitkonstanten. Diese sind in Tabelle 7.10 gegeben. Man kann daher davon ausgehen, dass die beiden Proben in gleichem Maße für die Photozyklusstudien geeignet sind.

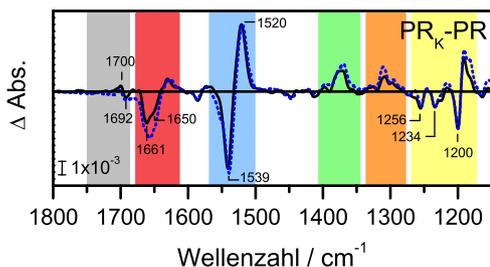
Das Bild ändert sich, wenn man die transienten Absorptionsänderungen bei pH 5,1 vergleicht (237 K). Die Kinetiken stimmen nicht länger überein. Die 2D-kristallisierten Proben erweisen sich als wesentlich stabiler. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Beobachtung, dass eine PR-Probe, nachdem sie für über 24 Stunden im pH 5,1-Puffer bei  $8^\circ\text{C}$  gelagert wurde, keinen kompletten Photozyklus mehr durchläuft. Man beobachtet lediglich die Retinalisomerisierung. Die für die nachfolgenden Studien benutzten Proben wurden daher erst kurz vor dem Messen auf den richtigen pH-Wert gepuffert. Für die Messungen im sauren pH-Bereich wurden prinzipiell die 2D-kristallisierten Proben benutzt.



**Abbildung 7.42:** Vergleich der Retinalreisomerisierung bei  $1538\text{cm}^{-1}$  für PR<sub>rek</sub> und PR<sub>2D</sub> bei pH 5,1 und 237 K sowie pH 9,0 und 257 K. Während die Kinetiken für pH 9,0 unabhängig von der Präparation sind, weisen sie bei pH 5,1 deutliche Unterschiede auf. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den biexponentiellen Fit der Daten.

## Der Tieftemperaturphotozyklus von Proteorhodopsin bei pH 9,0

In einem ersten Schritt wurden die lichtinduzierten Differenzspektren von rekonstituierten und 2D-kristallisierten PR-Proben bei einer Temperatur von 77 K untersucht (Abbildung 7.43). Die erhaltenen Differenzbanden stimmen mit dem charakteristischen Bandenmuster transienter Spektren bei ca. 1-2 ns überein. Man kann daher davon ausgehen, dass in Analogie zu BR das sogenannte K-Intermediat bei dieser Temperatur getrappt wird.



**Abbildung 7.43:**  $PR_K$ -PR-Differenzspektrum der  $PR_{2D}$ - (schwarz) und  $PR_{rek}$ -Probe (blau gepunktet) bei pH 9,0.

Schwingung	Bereich / $cm^{-1}$
COO ( $\delta$ )	oberhalb 1700
C=N ( $\nu$ )	um 1650
C=C ( $\nu$ )	um 1540
N-H ( $\delta$ )	1400 - 1300
C-H ( $\delta$ )	1300 - 1200
C-C ( $\nu$ )	um 1200

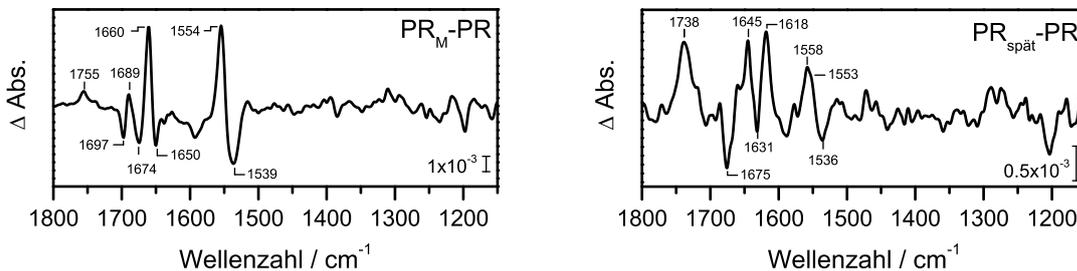
**Tabelle 7.11:** Chromophorbandenzuordnung des links gezeigten  $PR_K$ -PR-Spektrums.

In Referenz zu BR und bereits publizierten PR-Tieftemperatur-FTIR-Daten kann folgende Bandenzuordnung gemacht werden (Siehe Tabelle 7.11). Zwischen  $1180\text{ cm}^{-1}$  und  $1260\text{ cm}^{-1}$  befinden sich die Differenzbanden der C-C-Streckschwingung des Retinalchromophors. Die Kombination aus positiven Banden bei  $1182\text{ cm}^{-1}$  und  $1192\text{ cm}^{-1}$  und negativen Banden bei  $1200\text{ cm}^{-1}$ ,  $1234\text{ cm}^{-1}$  und  $1256\text{ cm}^{-1}$  wird hierbei der all-*trans* nach 13-*cis* Isomerisierung zugesprochen. Die ebenen N-H- und C-H-Deformationsschwingungen werden zwischen  $1360\text{ cm}^{-1}$  und  $1390\text{ cm}^{-1}$ , bzw.  $1290\text{ cm}^{-1}$  und  $1320\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Um  $1530\text{ cm}^{-1}$  sind die C=C-Streckschwingungen des Chromophors angesiedelt. Eine positive Produktdifferenzbande bei  $1520\text{ cm}^{-1}$  und eine ausgebleichte Grundzustandsbande bei  $1539\text{ cm}^{-1}$  sind charakteristisch für die Chromophorkonfiguration im K-Zustand. In transienten Absorptionsmessungen von gelabelten PR-Proben konnte zudem nachgewiesen werden, dass die analoge Signatur des Differenzspektrums zu langen Verzögerungszeiten bereits kleine Beiträge des Proteinrückgrats (Amid II) enthält [281]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese auch im Differenzspektrum bei 77 K enthalten sind. Die C=N-Streckschwingung des Chromophor-Schiffbasen-Links schließt sich im Spektrum bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  an. Auch in dieser Region sind erste Differenzbanden des Proteins zu erwarten [253, 256, 257, 279]. Im blauen Flügel des Differenzspektrums befindet sich eine kleine Differenzsignatur bei  $(-)/1692\text{ cm}^{-1}$  /  $(+)/1700\text{ cm}^{-1}$ . Diese wurde einer Störung von Asn-230 zugeordnet [253].

Vergleicht man die Differenzspektren für  $PR_{rek}$  und  $PR_{2D}$  so sind lediglich in der Amid I- bzw. C=N-Streckschwingungsregion kleinere Abweichungen zu erkennen. Diese müssen allerdings nicht signifikant sein, da die IR-Intensität durch die starke  $H_2O$ -Absorptionsbande in dieser Region sehr gering ist, was zu einem niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt. Die große Übereinstimmung beider Spektren zeigt allerdings

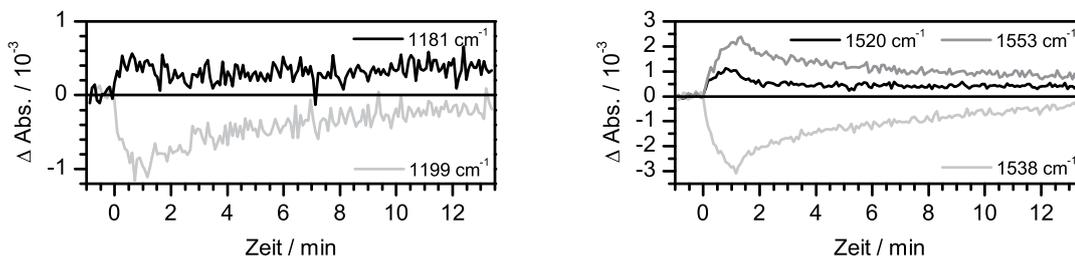
auch, dass die kristallisierten Proben nicht ausgerichtet sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das erhaltene Differenzspektrum bei 77 K mit publizierten Daten übereinstimmt und einem reinen  $\text{PR}_K$ -PR-Spektrum mit korrekter Isomerisierung entspricht. Spektren mit dieser Signatur können bis zu einer Temperatur von ca. 190 K erhalten werden. Dies ist höchstwahrscheinlich mit dem Glasübergang in Protein-Filmen verbunden. Unterhalb der Glasübergangstemperatur von etwa 190 K werden die Rotations- und Librationsfreiheitsgrade des Proteinkomplex gehemmt, wohingegen interne Proteinmoden wie Rotationen von Seitenketten oder auch die Isomerisierung des Chromophors davon unbeeinflusst bleiben [288].

Der sich dem K-Intermediat anschließende Photozyklus von PR besteht aus mehreren Gleichgewichten unterschiedlicher Intermediate [30, 31, 260, 275, 278]. Differenzspektren von reinen Intermediaten können daher bei einer bestimmten Temperatur nicht mehr gewonnen werden. Trotzdem kann das  $\text{PR}_M$ -PR-Differenzspektrum durch seine intensiven Banden problemlos aus zeitabhängigen RapidScan-Messungen bei 257 K extrahiert werden. Ein exemplarisches Spektrum ist in Abbildung 7.44, links, gezeigt. Neben den charakteristischen Amid I- ((+) $1660\text{ cm}^{-1}$ , (-) $1674\text{ cm}^{-1}$ , (+) $1689\text{ cm}^{-1}$ ) und Amid II-Änderungen ((-) $1539\text{ cm}^{-1}$ , (+) $1554\text{ cm}^{-1}$ ) ist oberhalb  $1700\text{ cm}^{-1}$  der Aufbau einer positiven Bande im Bereich der protonierten Aspartat- oder Glutamat-Carboxylat-Schwingung beobachtbar. Dieses wurde der Protonierung des primären Protonenakzeptors Asp-97 zugeordnet [30, 242]. Die zusätzlich erkennbaren Signaturen im Amid I-Bereich ((-) $1697\text{ cm}^{-1}$  / (-) $1650\text{ cm}^{-1}$ ) werden Beiträgen des N-Intermediats zugeordnet [30].



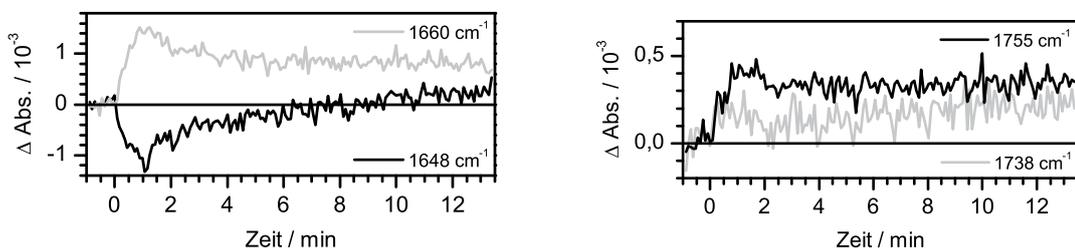
**Abbildung 7.44:**  $\text{PR}_M$ -PR- (257K, 1min) und  $\text{PR}_{\text{spät}}$ -PR-Differenzspektren (257 K, 40 min) des alkalischen Photozyklus von PR.

Das rechte Differenzspektrum in Abbildung 7.44 zeigt ein typisches Spektrum der späten Intermediate des Photozyklus. Die Merkmale sind zwei Signale im Carboxylat-Bereich, eins bei (+) $1718\text{ cm}^{-1}$  und ein breites bei (+) $1738\text{ cm}^{-1}$ , sowie ausgeprägte Charakteristika in den Proteinbanden. Im Amid I-Bereich werden Banden bei (+) $1618\text{ cm}^{-1}$ , (-) $1631\text{ cm}^{-1}$ , (+) $1645\text{ cm}^{-1}$  und (-) $1675\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Die Region der Amid II-Schwingung enthält eine Differenzbande bei (+) $1558\text{ cm}^{-1}$ , die wiederum eine Schulter bei (+) $1553\text{ cm}^{-1}$  aufweist. Die Bande bei  $1738\text{ cm}^{-1}$  wurde in einer früheren Publikation einer Umgebungsstörung des Donors Glu-108 zugeordnet [260]. Eine weitere Erklärung wäre ein Schieben der Resonanzfrequenz von Asp-97, wie man sie in BR beim Übergang vom M- zum N-Intermediat beobachtet hat ( $1761\text{ cm}^{-1}$  nach  $1755\text{ cm}^{-1}$ ) [202].



**Abbildung 7.45:** Von PR bei pH 9,0 aufgenommene transiente Absorptionsänderungen im Bereich der C-C- (links) und C=C-Streckschwingung (links) des Chromophors sowie des Amid II-Signals (rechts) bei 257 K.

Im Falle vom  $BR_N$  wurden diese Signale von einer starken negativen Differenzbande bei  $1670\text{ cm}^{-1}$  und zwei positiven bei  $1647\text{ cm}^{-1}$  und  $1610\text{ cm}^{-1}$  begleitet [202, 293]. Diese typische Charakteristik ist auch in dem für PR aufgenommenen Differenzspektrum erkennbar. Auch ein dem O-Intermediat ähnlicher Beitrag ist präsent, da die Bande bei  $1718\text{ cm}^{-1}$  in diesem Intermediat am ausgeprägtesten sein sollte. Im Gegensatz zu BR ist jedoch kein negatives Signal oberhalb von  $1700\text{ cm}^{-1}$  sichtbar, das auf eine transiente Deprotonierung einer Aspartat- oder Glutamatseitenkette hinweist. Die Übergänge der Intermediate können anschaulich in den transienten Absorptionsänderungen der Einzelwellenlängen beobachtet werden. Für diese Darstellung wurde eine Temperatur von 257 K gewählt. Bei dieser Temperatur stellt sich nach wenigen Minuten ein Gleichgewicht zwischen K- und M-Intermediat ein. Das Abklingen des K-Intermediats kann hierbei über die Kinetiken der C-C-Streckschwingungen bei  $(+)$  $1181\text{ cm}^{-1}$  und  $(-)$  $1199\text{ cm}^{-1}$ , sowie der für das K-Intermediat charakteristischen C=C-Streckschwingung bei  $1520\text{ cm}^{-1}$  beobachtet werden (Abbildung 7.45). Der sofortige Aufbau des M-Intermediats ist eindeutig an den bei 1,5 min maximalen Signal-Amplituden der Amid I- ( $(+)$  $1660\text{ cm}^{-1}$ ) und Amid II-Änderungen ( $(+)$  $1558\text{ cm}^{-1}$ ) sowie der protonierten Carboxylat-Charakteristika bei  $1755\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Mit dem Abbau dieser Signale ist auch ein Aufbau der Signaturen der späten Intermediate beobachtbar. Exemplarisch sind hierfür die Bildung

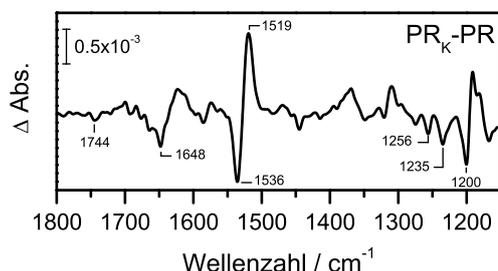


**Abbildung 7.46:** Transiente Absorptionsänderungen der Amid I- (links) und Carboxylat-Signale (rechts) von PR bei 257 K und pH 9,0.

der protonierten Aspartat- oder Glutamat-Spezies bei  $1738\text{ cm}^{-1}$  sowie der Zeitverlauf bei  $1648\text{ cm}^{-1}$  gezeigt, der die negative Signatur der gebleichten C=N-Streckschwingung im K-Intermediat hin zur Bildung der positiven Amid I-Änderung am Ende des Photozyklus darstellt (Abbildung 7.46). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Intermediatspektren sowie die Übergänge der Intermediate bei tiefen Temperaturen alle erwarteten Signale und Bandenshifts wie sie bei Raumtemperatur beobachtet wurden enthalten. Man kann daher davon ausgehen, dass der Wassergehalt der Proben hinreichend hoch ist, um einen vollständigen Protonentransport inklusive Helixänderungen auch bei teilgefrorenen Proben zu beobachten.

### Photoisomerisierung bei sauren pH-Werten

Abbildung 7.47 zeigt das bei 77 K aufgenommene lichtinduzierte Differenzspektrum für pH 5,1. Das Spektrum enthält alle für pH 9,0 diskutierten charakteristischen Chromophoränderungen in den Bereichen der C=N-Streckschwingung ( $(-)$  $1648\text{ cm}^{-1}$ ), der C=C-Streckschwingung ( $(+)$  $1519\text{ cm}^{-1}$  und  $(-)$  $1536\text{ cm}^{-1}$ ), der C-C-Streckschwingung ( $(+)$  $1191\text{ cm}^{-1}$ ,  $(-)$  $1200\text{ cm}^{-1}$ ,  $(-)$  $1235\text{ cm}^{-1}$ ,  $(-)$  $1256\text{ cm}^{-1}$ ), sowie dominante Beiträge im Bereich der ebenen N-H- und C-H-Deformationsschwingungen ( $1280\text{ cm}^{-1}$ -  $1400\text{ cm}^{-1}$ ). Die Differenzbanden im Bereich der C-C-Schwingung liegen hierbei an identischen Bandenpositionen wie bei pH 9,0. Man kann daher davon ausgehen, dass auch bei sauren pH-Werten eine korrekte all-*trans* nach 13-*cis* Isomerisierung stattfindet.



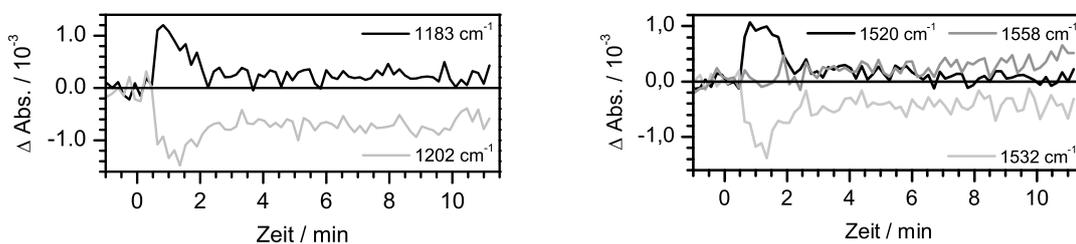
**Abbildung 7.47:** Bei 77 K aufgenommenes  $\text{PR}_K$ -PR-Differenzspektrum von PR bei pH 5,1.

Hingegen ist die Bandenposition der gebleichten C=C-Streckschwingung im Vergleich zu pH 9,0 verschoben (pH 9,0:  $1540\text{ cm}^{-1}$ , pH 5,1:  $1536\text{ cm}^{-1}$ ). Dies kann auf den linearen Zusammenhang zwischen dem Absorptionsmaximum des Chromophors im sichtbaren Spektralbereich mit der Position der C=C-Streckschwingung zurückgeführt werden ( $-4\text{ nm / cm}^{-1}$ ) [154, 179]. Das beobachtete pH-abhängige Schieben des Absorptionsmaximums von etwa 520 nm auf 530 nm passt sehr gut mit der gefundenen Verschiebung von  $3\text{ cm}^{-1}$  zusammen. Man kann daher die Position der gebleichten C=C-Streckschwingung als internen pH-Marker zur Validierung des eingestellten pH-Werts benutzen. Im Gegensatz zum Spektrum bei pH 9,0 ist im sauren pH-Bereich ein weiteres negatives Differenzsignal im Bereich der Carboxylat-Schwingung bei  $1744\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. In bereits publizierten Tieftemperaturmessungen bei saurem pH-Wert ist dieses Signal nicht

beschrieben [253, 256]. Andererseits berichten StepScan Messungen an rekonstituiertem PR bei pH 9,5 von einer stark vom pH-Wert abhängigen Bande bei  $(-)$ 1743  $\text{cm}^{-1}$ , die während des K-Zerfalls auftritt [260]. Auch im archaealen Retinalprotein BR ist ein solches Signal mit dem Zerfall des K-Intermediats verknüpft und wurde einer Störung oder Deprotonierung des primären Protonendonors Asp-96 zugeordnet [214, 294]. In Analogie hierzu kann das auftretende Signal daher einer Störung der homologen Aminosäure Glu-108 in PR zugeordnet werden. Das Auftreten dieses Signals wird als Indikator des L-Zustands benutzt. Die bereits im K-Spektrum auftretenden pH-abhängigen Unterschiede weisen auf den starken Einfluss struktureller Änderungen der Bindetasche wie Umordnung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks oder Änderungen der Protonierung einiger Aminosäuren wie Asp-97, Asp-227, Glu-108 oder His-75 hin.

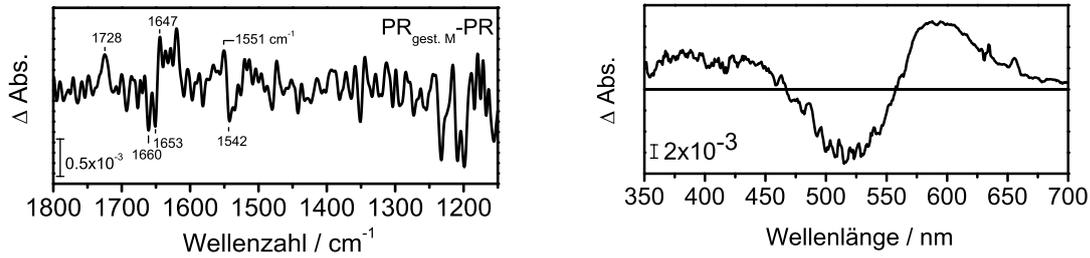
### Das M-Intermediat bei pH 5.1

Auch bei saurem pH-Wert folgen der ausgeprägten Signatur des  $\text{PR}_{K/L}$ -PR-Spektrums Differenzspektren, die keinem reinen Intermediat zugeordnet werden können, sondern einem Gleichgewicht von mindestens zwei Spezies [30, 31, 278] entsprechen. Die Separation der Signale wird noch dahingehend erschwert, dass bemerkenswert kleine Differenzsignale im Bereich von  $< 1$  mOD beobachtet werden. Dies kann eindrucksvoll im transienten Zerfall des K-Intermediats über die Absorptionsänderungen der C-C- und C=C-Streckschwingungen sowie dem Aufbau der positiven Amid II-Bande bei 1558  $\text{cm}^{-1}$  belegt werden (Abbildung 7.48).



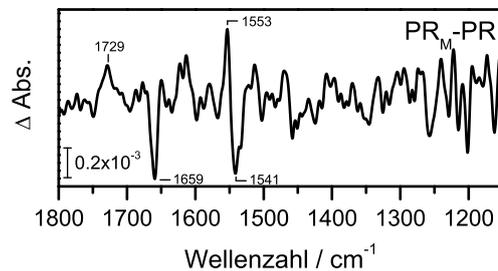
**Abbildung 7.48:** Bei 242 K aufgenommene transiente Absorptionsänderungen im Bereich der C-C- (links) und C=C-Streckschwingung (rechts) von PR bei pH 5,1.

Um eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Banden zum M-Intermediat zu erhalten, wurden simultan Differenzspektren im sichtbaren und mIR Bereich bei 237 K aufgenommen. Dieser Ansatz erlaubt die direkte Identifizierung des M-Zustands, da die mit der deprotonierten Schiffbasen-Konfiguration verbundene charakteristische Absorption dieses Intermediats um 400 nm isoliert von den Absorptionsbanden anderer Photointermediate ist. Ein typischer Satz zweier sichtbarer und infraroter Differenzspektren ist in Abbildung 7.49 gezeigt. Das sichtbare Spektrum zeigt durch die Absorption bei 425 nm eindeutig einen Beitrag des M-Intermediats. Darüber hinaus sind noch Beiträge von freiem Retinal einer geringen Menge denaturierten Proteins ((+)380 nm) und späterer Intermediate ((+)600 nm) zu sehen.



**Abbildung 7.49:** Vergleich der für PR bei pH 5,1 simultan aufgenommenen  $PR_{gest.M}$ -PR-Differenzspektren im sichtbaren und infraroten Spektralbereich (237 K, 8 min).

Diese Bandenzuordnung spiegelt sich auch im IR-Differenzspektrum wider. Neben Banden der späten Intermediate (Siehe Abbildung 7.51) sind Banden des M-Intermediats sichtbar. Durch gut überlegte Datenverarbeitung (Mittlung früher Differenzspektren bei 242 K) konnte ein relativ reines M-Differenzspektrum erhalten werden (Abbildung 7.50). Das erhaltene Spektrum wird von Amid II-Signalen bei  $(-)$ 1541  $cm^{-1}$  und  $(+)$ 1553  $cm^{-1}$  und einem negativen Amid I-Beitrag bei 1659  $cm^{-1}$  dominiert. Ein Vergleich zum Differenzspektrum bei pH 9,0 zeigt, dass die Amid II-Signale beider Spektren sehr ähnlich sind. Im Gegensatz hierzu ist aber das beobachtete Muster im Amid I-Bereich deutlich verschieden. Während für pH 9,0 eine positive Bande bei 1660  $cm^{-1}$  beobachtet wird, zeigt das Spektrum bei pH 5,1 eine negative Bande an dieser Position. Dies verdeutlicht noch einmal, dass bei beiden pH-Werten drastisch andere konformationelle Änderungen ablaufen. Wie im basischen pH-Bereich gehen die Amid-Änderungen mit einer positiven Bande im Bereich der Carboxylatschwingung bei  $(+)$ 1729  $cm^{-1}$  einher. Die Signatur des protonierten Asp-97 bei  $(+)$ 1755  $cm^{-1}$  ist nicht erkennbar. Dies ist jedoch auch nicht weiter erstaunlich, da Asp-97 bei diesen pH-Werten bereits zu einem hohen Prozentsatz protoniert vorliegen müsste. Die positive Signatur bei 1729  $cm^{-1}$  muss daher auf die Protonierung einer anderen Aminosäure (Glu oder Asp) zurückgeführt werden, die das Schiffbasen-Proton anstelle von Asp-97 annimmt. Berücksichtigt man die Umkehr der Protonenpumprichtung [30, 31], so ist Glu-108 ein sehr wahrscheinlicher Kandidat. Diese

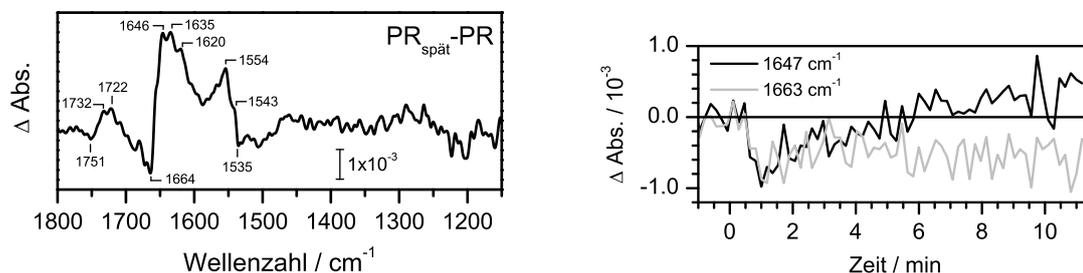


**Abbildung 7.50:** Durch die Mittlung früher Differenzspektren bei 242 K erzeugtes relativ reines  $PR_M$ -PR-Differenzspektrum bei pH 5,1.

These wird durch Studien von Friedrich et al. [30] und Dioumaev et al. [242] unterstützt. Beide ordneten ein positives Signal bei  $1728\text{ cm}^{-1}$  im alkalischen Photozyklus der transienten Protonierung von Glu-108 zu. Damit kann das Ausbleiben des M-Intermediats in StepScan- und Blitzlichtphotolyse-Messungen bei Raumtemperatur endgültig kinetischen Ursachen zugeschrieben werden. Das kleine oder nicht identifizierbare transiente M-Signal kann über eine Kombination aus langsamer Schiffbasen-Deprotonierung und schneller Reprotonierung erklärt werden. Durch das Absenken der Temperatur wurden nun sowohl die Reaktionsraten als auch die Energiebarrieren des Proteins erheblich geändert. Im Speziellen werden die Moden, die für die großen Helixbewegungen verantwortlich sind, beeinflusst, wodurch veränderte Reaktionsbarrieren entstehen sollten, die schlussendlich dazu führen, dass das M-Intermediat in Tieftemperaturuntersuchungen deutlich beobachtbar ist.

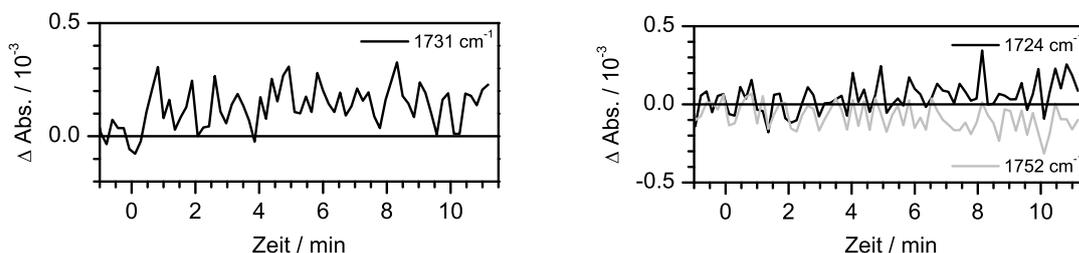
### Die späten Intermediate des PR Photozyklus bei pH 5.1

Am Ende des Photozyklus bei pH 5,1 sind wieder sehr starke Differenzbanden beobachtbar (Abbildung 7.51, links). Es ist anzunehmen, dass diese Banden von Intermediaten stammen, die dem  $\text{BR}_N$ - und  $\text{BR}_O$ -Intermediat von der Funktion her ähnlich sind. Das markanteste Kennzeichen des Spektrum ist ein Differenzbandenpaar in der Amid I-Region ( $(-)$  $1664\text{ cm}^{-1}$ ,  $(+)$  $1646\text{ cm}^{-1}$ ). Diese Signatur ist erstmals in dem gestörten M-Differenzspektrum beobachtbar und ist nun vollständig ausgeprägt. In Analogie zu



**Abbildung 7.51:**  $\text{PR}_{\text{spät}} - \text{PR}$ -Differenzspektrum bei pH 5,1 (237 K, 40 min) (links). Transiente Absorptionsänderungen im Bereich der Amid I- Schwingung bei pH 5.1 und 242 K (rechts).

$\text{BR}$ , in dessen Photozyklus starke Differenzbanden bei  $(-)$  $1670\text{ cm}^{-1}$  /  $(+)$  $1650\text{ cm}^{-1}$  dem  $\text{BR}_N$  Intermediat zugewiesen wurden, werden diese Banden Rückgratsbewegungen der Peptidcarbonyle zugeordnet [295]. Neben diesen Banden sind auch große Änderungen im Amid II-Bereich zugegen. Die negative Bande der gebleichten  $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung ( $(-)$  $1535\text{ cm}^{-1}$ ) ist von einer positiven Bande bei  $1554\text{ cm}^{-1}$  überlagert. Fehlende Beiträge rotverschoben zur negativen Grundzustandsbande implizieren, dass der Einfluss vom O-Intermediat gering ist. Neben den strukturellen Änderungen sind zudem im Bereich der Carboxylschwingungen Protonierungs- sowie Deprotonierungssignaturen erkennbar. Das bereits während des M-Intermediats auftretende Signal bei ca.  $1730\text{ cm}^{-1}$  (wahrscheinlich



**Abbildung 7.52:** Transiente Absorptionsänderungen im Bereich der Carboxylatseitenkettenschwingungen von PR bei pH 5.1 und 242 K.

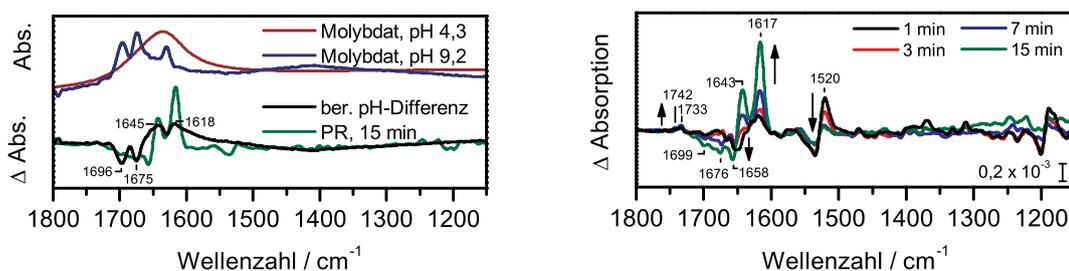
Glu-108) wird nun von einem später auftretenden weiteren positiven Signal bei  $1722\text{ cm}^{-1}$  begleitet. Der zeitliche Zusammenhang ist in Abbildung 7.52 gezeigt.

Eine Zuordnung kann zum gegebenen Zeitpunkt nicht gemacht werden. Es ist aber eher unwahrscheinlich dieses dem Protonen-Freisetzungskomplex, der wahrscheinlich aus Glu-245, Glu-50 und/oder Asp-52 besteht, zuzuschreiben, da für BR auch keine Differenzbanden für den analogen Komplex aus Glu-194 und Glu-204 gefunden wurden [201, 296]. Diese Beobachtung wurde in BR einem Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk im extrazellulären Halbkanal bestehend aus Asp-85, Arg-82, Glu-194 und Glu204 [201, 297] sowie dazwischenliegenden Wassermolekülen zugeschrieben [286]. Eine Protonierungsreaktion von Asp-227 kann hingegen nicht ausgeschlossen werden. Nicht zuletzt die Tatsache, dass diese Aminosäure aufgrund ihres sehr geringen  $\text{pK}_a$  Werts von 2,6 unprotoniert vorliegt [252, 259], unterstützt die These einer aktiven Rolle. Für BR konnte gezeigt werden, dass das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk der analogen Aminosäure Asp-212 eine sehr wichtige Rolle im Protonentransfer spielt [298]. Neben den bereits diskutierten positiven Signalen in der Region oberhalb  $1700\text{ cm}^{-1}$  beobachtet man für die Proben bei pH 5,1 noch eine negative Signatur um  $1751\text{ cm}^{-1}$ , die auf der gleichen Zeitskala wie die Signatur bei  $1724\text{ cm}^{-1}$  gebildet wird. Die Position der Bande legt eine Interpretation in Richtung transientser Deprotonierung von Asp-97 sehr nahe. Dies wird weiterhin dadurch unterstützt, dass eine ähnliche negative Bande im Fall von BR der Deprotonierung des Donors des Schiffbasen-Protons, Asp-96, zugeordnet wurde [202, 214].

### Beobachtung der Protonenfreisetzung bei pH 5,0

Um die Protonenpumpaktivität von Protein zu untersuchen, werden normalerweise Patch Clamp- oder BLM-Messungen benutzt [30, 31, 242, 299, 300]. Eine andere Möglichkeit ist es, Indikatorfarbstoffe zu benutzen, die es ermöglichen, sich ändernde Protonenkonzentrationen spektroskopisch zu detektieren. Der Indikator ist im vorliegenden Fall das als Puffer eingesetzte Molybdat. In diesem System nutzt man die Schwingungsmoden ( $\delta\text{-OH}$ ) zweier den verzerrten  $\text{MoO}_4$ -Tetraeder koordinierender Wassermoleküle, die sensitiv auf den pH-Wert sind. Abbildung 7.53 zeigt die starken Änderungen des Absorptionsspektrums bei extremen pH-Werten. Während im Basischen (pH 9.2) drei relativ scharfe Absorptionsbanden im Bereich von  $1600\text{ cm}^{-1}$  und  $1700\text{ cm}^{-1}$  beobachtet werden, ist im

Sauren (pH 4.3) lediglich eine relativ breite Absorptionsbande erkennbar. Berechnet man hieraus das pH-induzierte Differenzspektrum (um im Differenzspektrum scharfe Banden zu sehen, wurden die Banden des Spektrums bei pH 9,2 einer Feinstrukturverstärkung unterzogen [301]), so ergeben sich zwei negative Differenzbanden bei  $1696\text{ cm}^{-1}$  und  $1675\text{ cm}^{-1}$  sowie zwei positive bei  $1618\text{ cm}^{-1}$  und  $1645\text{ cm}^{-1}$ .

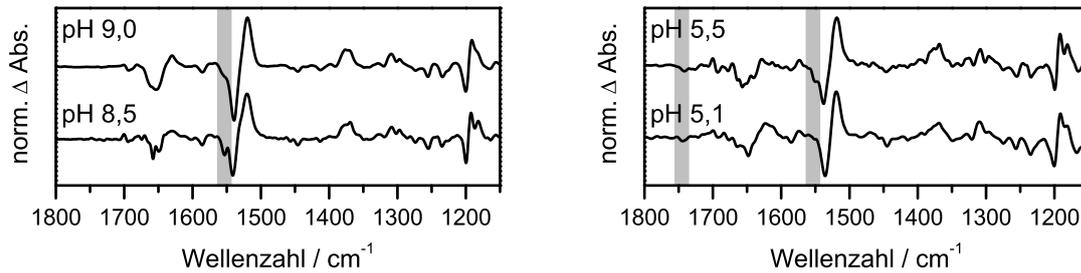


**Abbildung 7.53:** Links: Aus den pH-abhängigen Absorptionsspektren von  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  berechnetes pH-induziertes Differenzspektrum im Vergleich zum lichtinduzierten Differenzspektrums von PR in Molybdatspuffer bei pH 5,0 (15 min, 227 K). Rechts: Weitere transiente Differenzspektren von PR in Molybdatspuffer nach unterschiedlichen Zeiten.

Abbildung 7.53, rechts, zeigt die transienten FTIR-Differenzspektren von PR in Molybdatspuffer (pH 5,0, 237 K) nach 1, 3, 7 und 15 min. Der Zerfall des K-Intermediats kann eindeutig über die abnehmenden Signale der C=C- und C-C-Streckschwingungen ((-)1535  $\text{cm}^{-1}$ , (+)1520  $\text{cm}^{-1}$ , (-)1200  $\text{cm}^{-1}$ , (+)1191  $\text{cm}^{-1}$ ) beobachtet werden. Daneben wird die Bildung von positiven Banden im Bereich der Asp- und Glu-Carboxylatschwingung ((+)1742  $\text{cm}^{-1}$  und (+)1733  $\text{cm}^{-1}$ ) sowie einer negativen Bande im Amid I-Bereich (1658  $\text{cm}^{-1}$ ) sichtbar, was charakteristisch für das Gleichgewicht von M- und späten Intermediaten ist. Auf der gleichen Zeitskala werden im Differenzspektrum zusätzlich Differenzbanden mit einer sehr großen Amplitude bei (+)1617  $\text{cm}^{-1}$ , (+)1643  $\text{cm}^{-1}$ , (-)1676  $\text{cm}^{-1}$  und (-)1699  $\text{cm}^{-1}$  gebildet. Die Gegenüberstellung des PR-Differenzspektrums bei 15 min mit dem berechneten pH-induzierten Molybdatspektrum zeigt, dass diese Banden charakteristisch für die Protonierung des Puffers sind. Dieses Experiment macht daher deutlich, dass PR bei saurem pH-Wert nach Erreichen des M-Zustands Protonen pumpt. Die elektrophysiologischen Messungen von Friedrich et al. [30] und Lörinczi et al. [31] konnten durch eine weitere Methode bestätigt werden. Leider kann mit der benutzten Technik keine Aussage über die Pumprichtung getroffen werden.

### pH-Abhängigkeit des Photozyklus

Bereits publizierte Experimente haben gezeigt, dass gerichteter Protonentransfer bei pH-Werten  $\geq 9,0$  und  $\leq 5,0$  stattfindet [30, 31, 255]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse von sichtbarer und infraroter Spektroskopie bei tiefen Temperaturen haben gezeigt, dass alle mit den  $\text{H}^+$ -Translokationsschritten verbundenen Intermediate des Photozyklus vorhanden sind. Dennoch gibt es in der Literatur eine lang anhaltende



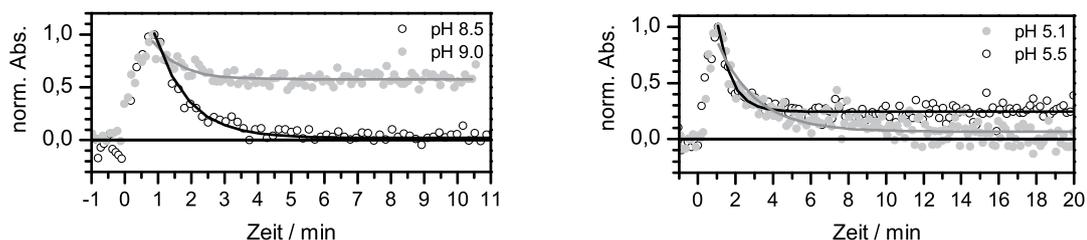
**Abbildung 7.54:** Bei 77 K aufgenommene  $PR_K$ -PR-Differenzspektren bei unterschiedlichen pH-Werten. Die deutlich erkennbaren spektralen Unterschiede bei Veränderung des pH-Werts um eine halbe Einheit sind grau unterlegt.

Diskussion über den aktiven Transport bei den verschiedenen pH-Werten. Beispielsweise berichteten Dioumaev et al. [242] eine dramatische Abnahme der Transportaktivität zwischen pH 9,0 und 8,5. Die Annahme der dramatischen pH-Sensitivität im Bereich des  $pK_a$ -Werts des Protonenakzeptors würde die in der Literatur variierenden Aussagen bezüglich der Pumpaktivität erklären. Kleine Änderungen des pH-Werts würde in diesem Fall nämlich schon ausreichen, um ein verändertes Verhalten zu beobachten. Aus diesem Grund wurden weitere Photozyklusstudien bei pH-Werten, die 0,5 Einheiten näher am  $pK_a$ -Wert des primären Protonenakzeptors Asp-97 liegen (pH 5,5 und 8,5), getätigt.

Abbildung 7.54 stellt die  $PR_K$ -PR-Differenzspektren bei den vier ausgewählten pH-Werten gegenüber. Alle Haupteigenschaften der all-*trans* nach 13-*cis*-Isomerisierung sowie das pH-abhängige Schieben der gebleichten C=C-Streckschwingung und die im Falle der niedrigen pH-Werte negative Bande bei etwa  $1740\text{ cm}^{-1}$  sind erhalten. Zusätzlich ist jedoch sowohl im Differenzspektrum bei pH 5,5 als auch in dem bei pH 8,5 eine weitere in Bildung begriffene positive Bande um  $1550\text{ cm}^{-1}$  beobachtbar, die die Differenzbande der C=C-Streckschwingung des K-Intermediats überlagert. Sie kann am ehesten einer Amid II-Änderung einer beginnenden konformationellen Änderung in Richtung des nachfolgenden M-Intermediats zugeordnet werden. Dies würde aber auch bedeuten, dass bei pH 5,5 sowie 8,5 die Reaktionsbarrieren zwischen K- und M-Intermediat deutlich erniedrigt sind.

Die beschriebenen charakteristischen Banden der nachfolgenden Intermediate sind auch in den Differenzspektren bei pH 5,5 und 8,5 erhalten. Die Verfügbarkeit zeitaufgelöster Daten liefert hierbei die Möglichkeit eines direkten Vergleichs der Dynamik bei pH 9,0 und 8,5 bzw. pH 5,1 und 5,5. Die Analyse der transienten Absorptionsänderungen bei unterschiedlichen Wellenzahlen zeigt signifikante Unterschiede zwischen pH 9,0 und 8,5 sowie 5,1 und 5,5.

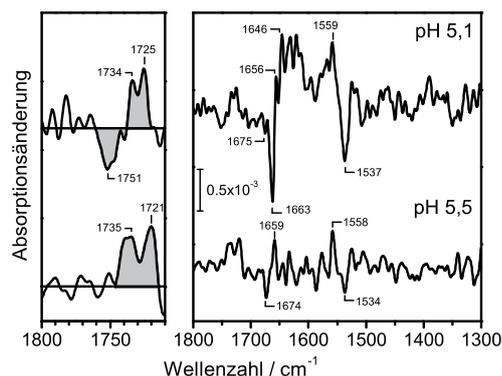
Für PR unter alkalischen Bedingungen kann dies sehr gut anhand der transienten Abnahme der positiven Amid II-Bande des M-Intermediats bei  $1554\text{ cm}^{-1}$  dargestellt werden (Abbildung 7.55). Bei pH 8,5 zerfällt diese Bande mit einer Zeitkonstante von 5 min, während die Kinetik bei pH 9,0 nach anfänglichem Zerfall eine Art Plateau erreicht. Da die mit dem M-Intermediat einhergehenden Änderungen im Differenzspektrum für saure pH-Werte sehr gering sind, ist es hier ratsamer den K-Zerfall gegenüberzustellen



**Abbildung 7.55:** Vergleich der transienten Absorptionsänderungen bei pH 9,0 und 8,5, bzw. 5,5 und 5,1. Die Kinetik im alkalischen pH-Bereich spiegelt die Depopulation des M-Intermediats über den Zerfall der Amid II-Bande ( $1554\text{ cm}^{-1}$ ) bei  $257\text{ K}$  wider. Unter sauren Bedingungen wurde ein Vergleich des Zerfalls des K-Intermediats ( $1520\text{ cm}^{-1}$ ,  $227\text{ K}$ ) gewählt. Die durchgezogenen Linien repräsentieren jeweils den Fit.

( $227\text{ K}$ ,  $1520\text{ cm}^{-1}$ ). Für beide pH-Werte ist eine rasche Zerfallskinetik zu beobachten, die sich aber darin unterscheidet, dass die transiente Absorptionsänderung bei pH 5,1 fast auf Null zerfällt, während die pH 5,5-Probe auf einem positiven Differenzsignal bleibt. Das nach wenigen Minuten erreichte Gleichgewicht enthält daher für pH 5,5 einen erhöhten Anteil an K-Intermediat. Dies zeigt, dass die Energiebarrieren der beobachteten Übergänge der Intermediate stark vom pH-Wert der Umgebung abhängen. Während Änderungen der Bandenposition auf strukturelle Änderungen sowie Modifizierung des Protonierungsgrads hinweisen, spiegelt die Änderung des kinetischen Verhaltens direkt den Einfluss auf das gerichtete Pumpverhalten wider. Das verkürzte Auftreten des M-Intermediats bei pH 8,5 kann beispielsweise auf eine verminderte Protonenfreisetzung hinweisen.

Der Einfluss kleinster pH-Änderungen ist für die sauren Bedingungen am ausgeprägtesten in den Differenzspektren am Ende des Photozyklus (Abbildung 7.56,  $242\text{ K}$ , 10 min nach Belichtung). Die sehr ausgeprägte positiv-negativ-Differenzbande im Amid I-Bereich



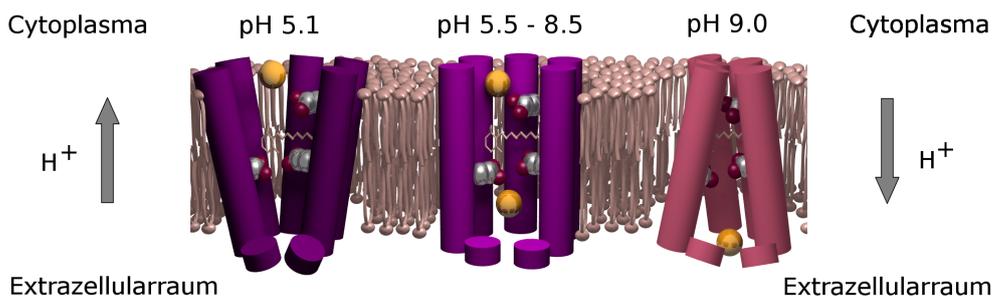
**Abbildung 7.56:** Bei  $242\text{ K}$  aufgenommenes  $\text{PR}_{\text{Spät}}\text{-PR}$ -Differenzspektrum von PR bei pH 5,1 und 5,5 (10 min). Deutliche pH-abhängige Unterschiede sind im Bereich der Amid I- sowie der Carboxylatschwingungen oberhalb von  $1700\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. Letztere Region ist links nochmals vergrößert dargestellt.

((-) $1663\text{ cm}^{-1}$ , (+) $1646\text{ cm}^{-1}$ ), die Rückgratsbewegungen der Peptidcarbonylgruppen im  $\text{PR}_N$ -Intermediat zugeordnet wurden, ist im Spektrum der pH 5,5 Probe nicht vorhanden. Es sind lediglich die bei pH 5,1 im Spektrum als Schulter auftretenden Differenzbanden bei (-) $1675\text{ cm}^{-1}$  und (+) $1656\text{ cm}^{-1}$  beobachtbar. Auch im Bereich der Carboxylat-schwingungen sind Änderungen beobachtbar. Die positive Bande um  $1735\text{ cm}^{-1}$  ist bei pH 5,5 wesentlich breiter. Zusätzlich ist die negative Signatur bei  $1751\text{ cm}^{-1}$ , die bei pH 5,1 der transienten Deprotonierung von Asp-97 zugeordnet wurde, im Differenzspektrum bei 5,5 nicht vorhanden. Alle Tatsachen zusammen sprechen dafür, dass ein Protonenpumpvorgang bei pH 5,5 überhaupt nicht oder nicht in vollem Ausmaß stattfinden kann, was ein weiterer Hinweis auf die dramatische pH-Abhängigkeit des PR-Photozyklus ist.

### Fazit

Die vorliegenden Daten zeigen den drastischen Einfluss kleinster Änderungen des pH-Werts auf den Photozyklus von PR. Dies zeigt, dass die funktionellen Eigenschaften von PR nicht nur vom  $\text{pK}_a$ -Wert des primären Protonenakzeptors bestimmt werden, sondern von dem Zusammenspiel mehrerer pH-sensitiver Gleichgewichte von Protonierungs-/Deprotonierungsreaktionen, die mit Umlagerungen des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks eng verknüpft sind. Große Bedeutung hat hierbei sicherlich das hochgradig konservierte His-75, dessen Seitenkette in freien Aminosäuren einen  $\text{pK}_a$ -Wert um 7 aufweist. Die Beteiligung eines Histidins am Gegenionkomplex wurde erst jüngst für das verwandte XR gezeigt [271]. Für PR konnten bereits NMR- und FTIR-Studien die Beteiligung am Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in der Retinalbindetasche zeigen [251, 254].

Aus den vorliegenden Daten lässt sich ein Drei-Zustands-Modell für PR ableiten. Eine schematische Darstellung des Modells ist in Abbildung 7.57 gezeigt.



**Abbildung 7.57:** Vorgeschlagene pH-Abhängigkeit des Pumpmechanismus von PR. Nach bereits publizierten Resultaten findet für pH-Werte  $> 9,0$  nach außen gerichtetes Pumpen statt. Zwischen pH 8,5 und 5,5, also um den  $\text{pK}_a$  Wert der Schlüsselaminosäure Asp-97, wurden hingegen keine großen Proteinänderungen beobachtet, was dahingehend interpretiert wurde, dass Protonen nicht gerichtet transportiert werden. Bei pH 5,1 werden wieder die zum Transport benötigten großen Amid-Änderungen beobachtet. Nach Lőrinczi et al. [31] und Friedrich et al. [30] findet hier nach innen gerichteter Transport statt.

Bei pH 9,0 liegt ein BR-ähnlicher Photozyklus vor, bei dem Protonen in den extrazellulären Raum gepumpt werden [30, 31, 242]. Auch unter sauren Bedingungen ( $\text{pH} \leq 5,1$ ) zeigten elektrophysiologische Messungen gerichteten Protonentransport, jedoch in entgegengesetzter Richtung. Die präsentierten Daten beweisen, dass hierbei ausgeprägte Helixbewegungen stattfinden. Eine Zuordnung der Protonenakzeptorsignatur zum Glu-108 bestätigt zudem die Annahme der invertierten Pumprichtung.

Bei pH-Werten zwischen 5,5 und 8,5 wurden hingegen nur geringe Helixbewegungen festgestellt. Auch die Protonierungsreaktionen verlaufen signifikant anders als an den Extrem-pH-Werten. Dies spricht dafür, dass kein gerichteter Protonentransport bei diesen pH-Werten stattfindet.

### 7.7 Resümee

In der vorliegenden Arbeit wurde der PR-Photozyklus durch die Verwendung unterschiedlichster Techniken hinsichtlich mehrerer Aspekte betrachtet. Zur Untersuchung der ersten Schritte des Photozyklus, nämlich der Isomerisierung des Retinalchromophors von der all-*trans*- in die 13-*cis*-Konfiguration, wurden Anreg- / Abtast-Experimente im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden Messungen am Wildtyp-Protein in deuteriertem Puffer bei pD-Werten getätigt, an denen der primäre Protonenakzeptor Asp-97 deprotoniert (pD 9,2) sowie protoniert (pD 6,4) vorliegt. Die Messungen unter diesen Bedingungen konnten die bereits von Lenz et al. [273] und Huber et al. [272] in H<sub>2</sub>O beobachtete pH-abhängige Deaktivierung des angeregten Zustands validieren. Ein Vergleich der Zerfallszeiten des angeregten Zustands mit den in oben genannten Messungen erhaltenen Zeiten ergab die Möglichkeit, Aussagen über das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in der Retinalbindetasche zu treffen. Die signifikanten pH-abhängigen Unterschiede des berechneten kinetischen Isotopeneffekts ( $\text{pH } 9 = 2,3$   $\text{pH } 6 = 1,6$ ) weisen auf ein deutlich unterschiedliches Wasserstoffbrückenmuster unter sauren und alkalischen Bedingungen hin. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Tieftemperatur-FTIR-Messungen aus der Gruppe Kandori [256], die zeigen, dass die Wassercluster und deren Verbrückung in der Bindetasche bei pH 5 und pH 10 signifikant anders sind, da ein stark verbrücktes Wassermolekül nur unter alkalischen Bedingungen beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis spricht wiederum dafür, dass die pH-abhängigen dynamischen Unterschiede der Primärreaktion in PR wahrscheinlich nicht nur elektrostatischer Natur sind, sondern auch in erheblichem Ausmaß durch veränderte Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen werden. Um diesem Resultat weiter nachzugehen, wurde in analoger Weise eine PR-Mutante untersucht, bei der der primäre Protonenakzeptor Asp-97 zu Asparagin mutiert wurde. Dies bedeutet chemisch, dass die Säuregruppe der Aspartatseitenkette durch eine Säureamidgruppe ersetzt wurde, die im beobachteten pH-Bereich nicht protonierbar bzw. deprotonierbar ist. Sie sollte daher ein Modellsystem für das Wildtyp-Protein unter sauren Bedingungen sein. Die Anpassung der erhaltenen transienten Daten dieser Mutante zeigte auch, dass die Dynamik nur unwesentlich langsamer als bei PR wt bei

pD 6,4 abläuft. Auch der berechnete kinetische Isotopeneffekt lag mit einem mittleren Wert von 1,4 im Bereich für PR bei pD/pH 6 und deutlich unterhalb des berechneten Werts für alkalische Bedingungen. Man kann daher davon ausgehen, dass das Wasserstoffbrückenmuster in der D97N-Mutante große Ähnlichkeit mit dem des Wildtyp-Proteins bei pH 6 hat.

Um weitergehende Einsichten in die Primärdynamik zu erlangen, wurden am Wildtyp-Protein bei pD 6,4 und pD 9,2 sowie der D97N-Mutante transiente Absorptionsmessungen im Bereich der C=C-Streckschwingung des Retinalchromophors und der C=N-Streckschwingung der Schiffbasenverknüpfung durchgeführt. Es zeigte sich, dass die beobachtete Dynamik keine Einblicke in die Isomerisierung bzw. die Deaktivierung des angeregten Zustands gibt, sondern hauptsächlich die Änderung der molekularen Temperatur widerspiegelt, die wiederum pH-unabhängig ist. Da die Absorptionsbanden im infraroten Spektralbereich aber im Bereich der C=N-Streckschwingung keine pH-abhängige Verschiebung der Bandenposition aufweisen und diese im Bereich der C=C-Streckschwingung lediglich  $3\text{ cm}^{-1}$  beträgt, konnten für das Wildtyp-Protein trotzdem wichtige Informationen über die Quantenausbeute der Bildung des K-Intermediats gewonnen werden. Hierzu wurden die  $\text{PR}_K$ -PR-Differenzspektren auf das instantane Bleichsignal nach Photoanregung skaliert, welches direkt proportional zur Anzahl angeregter Moleküle ist. Die Übereinstimmung der Differenzspektren bei pD 6,4 und pD 9,2 stellt anschaulich dar, dass die Quantenausbeute der K-Bildung für beide pD-Werte gleich ist.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss des hochkonservierten His-75 auf die Isomerisierungsdynamik untersucht. Hierfür wurden zwei Mutanten benutzt: Im ersten Fall wurde das geladene Histidin gegen ein ungeladenes Asparagin ausgetauscht (H75N). Im zweiten Fall wurde die Position 75 mit einem Methionin besetzt (H75M), da dieses an der analogen Stelle in BR zu finden ist. Die Titrationskurven der Retinalabsorption im sichtbaren Spektralbereich zeigen, dass der  $\text{pK}_a$ -Wert des primären Protonenakzeptors bei der H75M-Mutante um 0,5 pH-Einheiten und bei der H75N-Mutante um 2 pH-Einheiten erniedrigt ist. Unter Annahme einer Wasserstoffbrücke zwischen Asp-97 und His-75 [251, 254] bedeutet dies, dass das Histidin eine stabilisierende Wirkung auf den  $\text{pK}_a$  des Protonenakzeptors Asp-97 hat und das Proton der Säuregruppe somit in den Mutanten deutlich azider ist. Die Kurzzeitmessungen lassen jedoch keinen ausgeprägten Einfluss der Mutationen auf die Isomerisierungsdynamik erkennen. Ein Vergleich der Zerfallszeiten der H75N-Mutante und des Wildtyp-Proteins ergab lediglich bei sauren Bedingungen Abweichungen in der längeren Komponente  $\tau_3$ . Dies bedeutet, dass die elektrostatischen und sterischen Eigenschaften wie auch das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in der direkten Nachbarschaft des Retinals in der H75N-Mutante sehr ähnlich sind. Dieses Resultat stimmt mit NMR-Studien überein, in denen gezeigt wurde, dass die Umgebung der Schiffbase nicht von den Mutationen beeinflusst ist [251]. Auch die H75M-Daten weisen eine große Ähnlichkeit zu den Wildtyp-Daten auf, wobei die pH-Abhängigkeit hier geringer ausgeprägt ist. Über die Gründe hierfür kann nur spekuliert werden. Mögliche Ursachen sind die erhöhte Hydrophobizität in der Umgebung des Aspartats, sowie ein Einfluss des Schwefelzentrums auf die Elektrostatik.

Neben den Untersuchungen der Primärdynamik war auch der nachfolgende Teil des Photozyklus im Blickpunkt dieser Arbeit. Durch Tieftemperaturuntersuchungen im sichtbaren Spektralbereich konnte gezeigt werden, dass der dem K-Intermediat nachfolgende Photozyklus oberhalb von etwa 180 K beobachtet werden kann. Diese Temperatur stimmt ungefähr mit dem Glasübergang in Proteinfilmern überein [288], sodass der beobachtete Übergang vom K-Zustand in die nachfolgenden Intermediate auf hiermit verbundene Effekte zurückgeführt werden kann. Das Hauptresultat dieser Studie war jedoch, dass das unter kinetischen Bedingungen nicht beobachtbare M-Intermediat des sauren PR-Photozyklus bei tiefen Temperaturen vorgefunden wurde. Die Ergebnisse dieser Studie validieren somit die von Friedrich et al. [30] und Lörinczi et al. [31] beobachtete Umkehr der Pumprichtung in dem Sinne, als dass sie das für den Pump-Mechanismus wichtige M-Intermediat nachweisen.

Um strukturelle Einblicke in den Photozyklus zu bekommen und die am Pumpvorgang beteiligten Aminosäuren zu identifizieren, wurden nachfolgend Tieftemperaturuntersuchungen im infraroten Spektralbereich bei mehreren pH-Werten durchgeführt. Die Implementierung eines sichtbaren Faserspektrometers in den Strahlengang des FTIR-Aufbaus erlaubte hierbei den M-Zustand sowie die nachfolgenden späten Intermediate des sauren PR-Photozyklus im sichtbaren und infraroten Spektralbereich simultan zu detektieren und somit eindeutig zu charakterisieren. Für den M-Zustand bei pH 5,1 konnte gezeigt werden, dass auch in diesem pH-Bereich eine Aspartat- oder Glutamat-Seitenkette als Protonenakzeptor fungiert. Die Bandenposition legt dabei die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Glu-108 handelt. Weiterhin stellte sich heraus, dass sich die Differenzspektren sowie die Dynamik bei pH 9,0 und 8,5 sowie die bei pH 5,1 und 5,5 signifikant unterscheiden. Beispielsweise treten große strukturelle Änderungen nur bei pH-Werten von  $> 9,0$  sowie  $< 5,1$  auf, während für die dazwischen liegenden pH-Bedingungen lediglich geringe Amid-Differenzsignale beobachtet werden. In Anlehnung an elektrophysiologische Messungen [31, 242] wurde dies dahingehend interpretiert, dass ein gerichteter Pumpvorgang zwischen pH 8,5 und pH 5,5 nicht stattfindet, was in der Postulierung eines Drei-Zustands-Modell für PR resultiert. Dieses Modell vermag es vielleicht auch, die unterschiedlichen Aussagen bezüglich des gerichteten Pumpens im Allgemeinen und der Inversion der Pumprichtung im Speziellen zu erklären. Abermals zeigt sich somit, dass die Funktion von PR nicht allein vom  $pK_a$ -Wert des primären Protonenakzeptors abhängt, sondern höchstwahrscheinlich durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Gleichgewichte bestimmt wird.

# 8 Zeitaufgelöste Untersuchungen am eukaryotischen Retinalprotein Channelrhodopsin-2

*Das Problem zu erkennen ist wichtiger, als die Lösung zu erkennen, denn die genaue Darstellung des Problems führt zur Lösung.*

Albert Einstein

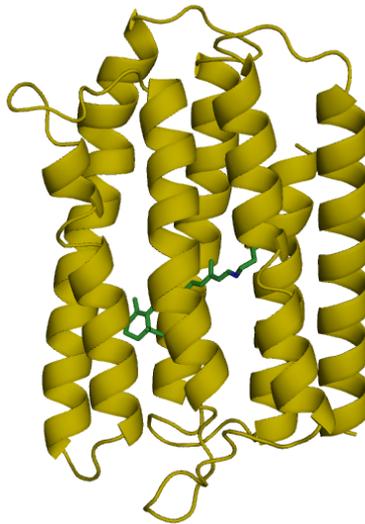
## 8.1 Einleitung

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt sieben Opsin-ähnliche Gene (COP genannt), die retinalhaltige Proteine kodieren, die unter der Bezeichnung Chlamyrhodopsine (CRs) geführt werden [302]. Das Gen COP1/2 kodiert dabei durch unterschiedliche Splicing-Mechanismen zwei Rhodopsine. Es wird angenommen, dass die Proteine CR1 und CR2 in Verbindung mit der Regulation von Photosystem I stehen [303]. Die Gene COP3 und 4 kodieren zwei Ionenkanäle, die Channelrhodopsin-1 (ChR-1) und Channelrhodopsin-2 (ChR-2) genannt werden [304]. Für ChR-1 wurde zuerst angenommen, dass der Kanal lediglich Protonen durchlässt [305, 306]. Neuere elektrophysiologische Untersuchungen bei hohen pH-Werten ergaben jedoch, dass ChR-1 wie ChR-2 auch für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel ist [304]. ChR-1 und ChR-2 sind zusammen für das phototaktische und photophobische Verhalten der Alge zuständig [10, 11]. Die Gene COP5 bis COP8 kodieren große Proteine, die jeweils einem Zwei-Komponenten-System aus N-terminalem Rhodopsin, einer Histidinkinase, einem Regulatorprotein und einer C-terminalen Zyklyase ähneln [307]. Die funktionelle und biophysikalische Charakterisierung der Proteine ChR-1 und ChR-2 ist Gegenstand momentaner Forschung. Die vorliegende Arbeit fokussiert dabei auf ChR-2. Bekannt wurde dieses Protein vor allem durch seinen Einsatz in der Neurobiologie. Zellen können nach Einbau dieses Proteins innerhalb weniger Millisekunden licht-gesteuert depolarisiert werden. Im Zusammenspiel mit der archaealen Chloridionenpumpe Halorhodopsin (HR), durch die Zellen licht-gesteuert polarisiert werden können, wird dieses System zur optogenetischen Kontrolle genutzt [12–15].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden mit der N-terminalen Sequenz bestehend aus den Aminosäuren 1 - 315 durchgeführt [308]. Sie beschreibt lediglich das Sieben-Transmembran-Motiv und weist eine hohe Sequenzanalogie zu archaealen Retinalproteinen auf. Es zeigte sich, dass der gekürzte Abschnitt für die Funktionalität des Proteins ausreichend ist. Sowohl das Stimulieren des kompletten als auch des gekürzten

Konstrukts ergibt kein nachgeschaltetes Öffnen endogener Calcium- oder Chloridkanäle, wodurch man davon ausgehen kann, dass kein G-Protein gekoppelter Transduktionsmechanismus vorliegt. Dass der C-Terminus ein Überträger-Protein ähnlich den halobakteriellen Transducern von Sensorrhodopsin I (SRI) und Sensorrhodopsin II (SR II) beschreibt, kann hingegen nicht ausgeschlossen werden.

Die Kristallstruktur von ChR-2 ist bis heute nicht gelöst. Die Aminosäuresequenz lässt sich jedoch gut an die Strukturen von Sensorrhodopsin II aus dem Organismus *Natronomonas pharaonis* oder Bakteriorhodopsin (BR) modellieren, wobei die Anpassung an NpSR II aufgrund der C-terminalen Proteinsequenz passender erscheint. Abbildung 8.1) zeigt die vorhergesagte Struktur von ChR-2 nach Modellierung an NpSR II. Für Helix C, auf der die Seitenketten des primären Protonenakzeptors und -donors archaealer Retinalproteine zu finden sind, besitzen BR und ChR-2 eine Sequenzhomologie von 85% [306].



**Abbildung 8.1:** Durch Homologiemodellierung an NpSR II (PDB-Datenbank: 1H68) vorhergesagte Struktur von ChR-2 (SWISS-MODEL <http://swissmodel.expasy.org/>). Das Peptidrückgrad ist als Cartoon in gelb dargestellt, der Retinalchromophor als Stäbchenmodell in grün.

Mutationsstudien konnten zeigen, dass die Protonierung des an der analogen Stelle zu BR Asp-85 sitzende Glu-123 ausschlaggebend für die Desensibilisierung des Kanals ist. Auch das Ersetzen der Aminosäure an der homologen Position des Protonendonors His-134 (Asp-96 in BR) hat einen signifikanten Einfluss auf den Kanal [308]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die an den analogen Positionen des Protonenakzeptors und -donors gefundenen Aminosäuren Glu-123 und His-134 auch im Photozyklus von ChR-2 eine wesentliche Rolle spielen.

Die große Bedeutung von ChRs veranlasste eine Reihe spektroskopischer und elektrophysiologischer Studien in den letzten Jahren [309–315]. Resonanz Raman und Retinalextraktionsexperimente konnten dabei zeigen, dass etwa 70% der Chromophore

in der all-*trans*-Konfiguration vorliegen und ein kleinerer Anteil einen 13-*cis*-Retinal-Chromophor enthält. Nach Lichtadaption ändert sich das Isomerenverhältnis nicht signifikant. Lediglich eine kleine zusätzliche Population (5%) wird sichtbar, die mit hoher Wahrscheinlichkeit der 9-*cis*-Konfiguration zugeordnet werden kann [315]. In Blitzlicht-photolysemessungen konnte gezeigt werden, dass das erste rot-verschobene Intermediat, K, 50 ns nach Photoanregung zu beobachten ist [310]. Tieftemperatur-FTIR-Messungen bei 80 K ermöglichten diesen K-Zustand anzureichern und machten deutlich, dass das Retinal in diesem Zustand eine all-*trans* nach 13-*cis* Isomerisierung vollzogen hat [313]. Zusätzlich wurden große konformationelle Änderungen im Bereich der Amid I Bande beobachtet [313, 314], die in dieser Form für Retinalproteine gänzlich unbekannt waren. Radu et al. [313] interpretierten diese Differenzbanden als Bildung der Pore. Mit einer Zeitkonstante von 4  $\mu$ s wird das nachfolgende Intermediat gebildet. Das Absorptionsmaximum bei 380 nm legt nahe, dass die Schiff Base in einem deprotonierten Zustand vorliegt, wie dies im M-Zustand von BR der Fall ist [16, 21]. Elektrophysiologischen Messungen zufolge ist der Kanal zu dieser Zeit immer noch geschlossen. Er öffnet sich im nachfolgenden Reaktionsschritt zu einem rot-verschobenem Photozyklusintermediat, das sein Absorptionsmaximum bei 520 nm besitzt. Über FTIR-Spektroskopie sind nur geringe weitere konformationelle Änderungen für diesen Zustand zu beobachten. Das Schließen des Kanals wird mit Zeitkonstanten im Bereich von 10 - 30 ms beobachtet [309, 311]. Spektroskopisch findet ein spektral stiller Übergang zu einem weiteren rot-verschobenen Übergang statt. Der Grundzustand wird mit einer Zeitkonstante von ca. 5 s repopuliert. Dieser Schritt beinhaltet die Desensibilisierung des Kanals sowie die Rückbildung der Struktur. IR-Messungen weisen darauf hin, dass das Wasserstoffbrückennetzwerk des Grundzustand während dieses Prozesses wieder hergestellt wird [313, 314].

## 8.2 Retinalisomerisierung in Channelrhodopsin-2

In einem ersten Schritt wurde die Primärdynamik von ChR-2 nach Photoanregung untersucht. Die benutzte Anreg-/ Abtast-Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich ermöglicht hierbei das Verhalten des Chromophors mit einer Zeitauflösung von etwa 100 fs zu verfolgen. Die Messungen wurden mit und ohne kontinuierliche Weißlichtbestrahlung durchgeführt, um einen möglichen Einfluss durch Licht-/ Dunkel-Adaption auszuschließen. Darüber hinaus wurde die Anregungswellenlänge von 420 nm im kurzwelligen auf 480 nm im langwelligen Bereich des Absorptionsspektrums variiert. Um ungestörte Einblicke in die S<sub>1</sub>-Deaktivierungspfade zu erhalten, wurde zudem ein Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsexperiment durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind in den nachfolgenden Artikel eingeflossen:

Verhoeven, M.-K., Bamann, C., Blöcher, R., Förster, U., Bamberg, E. and Wachtveitl, J., *The photocycle of channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps.*, (2010), ChemPhysChem, **11**: 3113-3122.

## Experimentelle Vorgehensweise

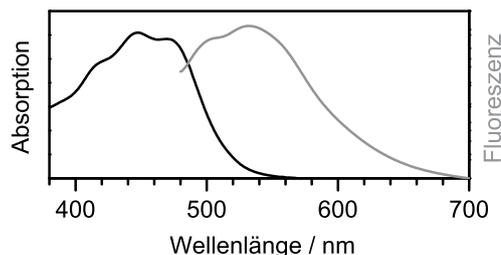
Transiente Absorptionsmessungen wurden mit dem in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Aufbau durchgeführt. Die solubilisierte ChR-2 Probe (bereitgestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bamberg, MPI für Biophysik, Universität Frankfurt) war dabei in 20mM HEPES bei pH 7,4 gepuffert und enthielt zudem 0,2 % DM, 500 mM Imidazol sowie 100 mM NaCl. Es wurde mit einer optischen Dichte von 0,5 bei 450 nm in 1mm Quarzglasküvetten gemessen. Die Anregungswellenlänge von 480 nm wurde über die optische Konversion im NOPA realisiert. Anregungsenergien von  $\approx 30$  nJ wurden benutzt. Aufgrund der Verwendung eines Prismenkompressors konnten Pulsdauern von 80 fs erlangt werden. Der Anrempuls war parallel zum Abtastpuls polarisiert. Um die Probe bei 420 nm anzuregen wurden Pulse des NOPAs mit Laserfundamentalpuls in einem Summenfrequenzmischprozess konvertiert. Auch hier wurden Anregungsenergien von  $\approx 30$  nJ gewählt um vergleichbare Messbedingungen zu schaffen. Da kein UV-geeigneter Kompressor zur Verfügung stand hatten die Pulse eine Kreuzkorrelationsbreite  $\geq 150$  fs. Die Anregungspulse waren senkrecht zum Abtastlicht polarisiert. Das Weißlicht wurde durch Fokussierung in ein CaF<sub>2</sub>-Substrat ( $d = 2$  mm) hergestellt. Es deckte einen Bereich von 380 nm - 710 nm ab.

Für die transienten Absorptionsmessungen unter Dauerbelichtung wurde für die Anregung eine Wellenlänge von 480 nm benutzt. Die Pulsenergien lagen wieder bei  $\approx 30$  nJ. Die Abtastung erfolgte jedoch mit Einzelfilament-Weißlicht, das in einem Saphir-Substrat generiert wurde. Ein spektraler Bereich von 430 nm - 750 nm wurde abgedeckt. Um eine licht-adaptierte Probe zu messen wurde diese während der Messung über eine Faser mit Licht einer Hg-Xe-Lampe (LC-08, Hamamatsu) beleuchtet. Um den UV-Anteil abzublocken wurde ein Gelbglasfilter (GG 460) zwischengeschaltet, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Belichtung mit Wellenlängen  $\geq 460$  nm durchgeführt wurde. Bei allen Messungen wurde die Probe zum Austausch lateral bewegt. UV-vis-Spektren vor und nach der Messung wiesen auf keine signifikante Degradation der Probe während der Messung hin.

Die Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsmessungen wurden mit dem in Kapitel 3.5 dargestellten Aufbau durchgeführt. Der durchstimmbare Laser wurde für das durchgeführte Experiment auf eine Zentralwellenlänge von 830 nm eingestellt. Anregungspulse von 415 nm wurden durch Frequenzverdopplung generiert. Die Pulse waren etwa 120 fs lang und hatten eine Energie von 300 nJ. Die durch Anregung der Probe (optische Dichte von 0,8 in 1 mm Quarzküvette) entstehende Fluoreszenz wurde in einem Summenfrequenzmischprozess ( $\theta = 51^\circ$ ,  $d = 0,1$  mm, Typ-II Phasenanpassung) mit dem Gatepuls (120  $\mu$ J) aufwärtskonvertiert. Das aufwärtskonvertierte Licht wurde räumlich gefiltert in die Detektionseinheit gelenkt. Das Experiment wurde bei einer Aufwärtskonvertierungswellenlänge von 320 nm durchgeführt was einer Fluoreszenzwellenlänge von 520 nm entspricht. Es wurde eine Kreuzkorrelationsbreite von 150 fs bestimmt.

## UV-vis-Absorptionsspektroskopie

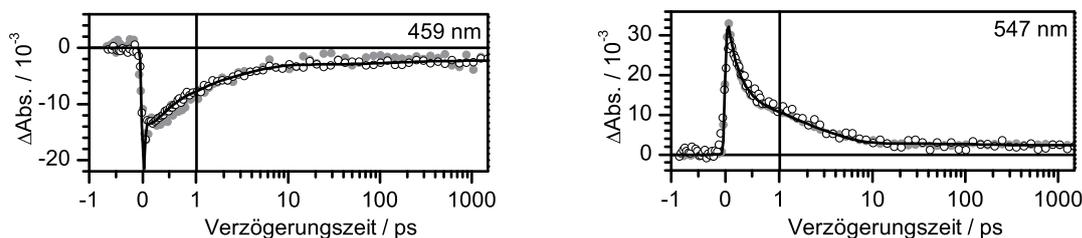
Das Absorptionsspektrum von ChR-2 weist im Bereich von 400 nm bis 500 nm eine deutlich strukturierte Absorptionsbande auf, deren Ursprung bis jetzt nicht eindeutig geklärt ist. Da unterschiedliche Retinalisomere auf Grund der Halbwertsbreite der Banden ausgeschlossen werden können, ist jedoch die Annahme, dass es sich um eine Feinstruktur handelt, wie man sie auch für NpSR<sub>II</sub> gefunden hat [316], sehr wahrscheinlich.



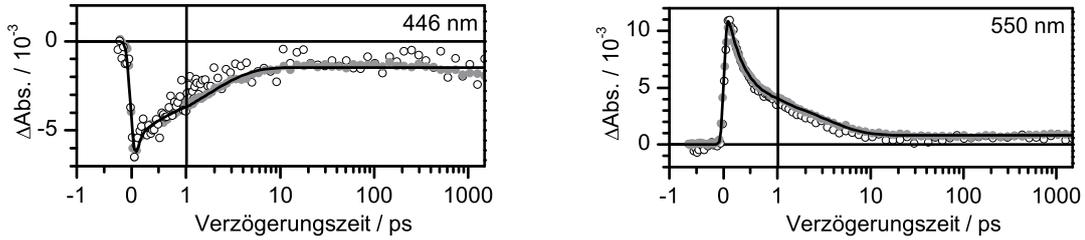
**Abbildung 8.2:** Statische Charakterisierung von ChR-2 bei pH 7,4 im sichtbaren Spektralbereich. Das Absorptions- (schwarz) und Fluoreszenzspektrum (grau) (Anregung bei 450 nm) weisen eine deutliche Struktur auf.

## Transiente Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich

Um dennoch unterschiedliche Populationen, wie z.B. Variationen in der Retinalzusammensetzung oder unterschiedliche pH-abhängige Protonierungszustände in der Bindetasche ausschließen zu können, wurden transiente Absorptionsmessungen mit Anregungswellenlängen im blauen (420 nm) und in der roten Flanke (480 nm) der Absorptionsbande durchgeführt. In Abbildung 8.3 sind exemplarisch transiente Absorptionsänderungen im Bereich des Grundzustandsbleichens und der Absorption des Photoprodukts nach Anregung bei beiden Wellenlängen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Dynamiken nach Photoanregung dem gleichen zeitlichen Verlauf folgen. Beide Datensätze konnten mit sehr ähnlichen Fitparametern angepasst werden.

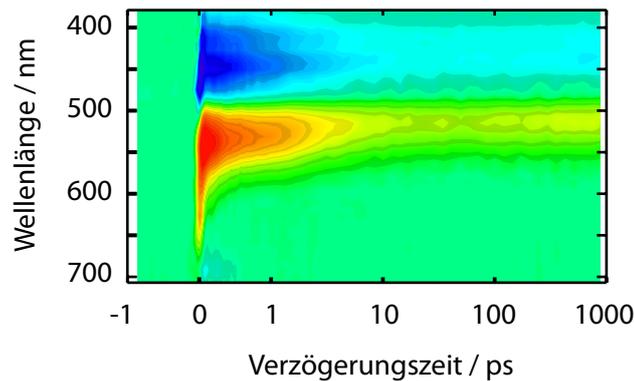


**Abbildung 8.3:** Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 nach Photoanregung bei 420 nm (●) und 480 nm (○). Die Transiente bei 459 nm beschreibt dabei den Bereich des Grundzustandsbleichens, während die Änderungen bei 547 nm den Bereich der Absorption des angeregten Zustands sowie des Photoprodukts widerspiegeln. Der globale Fit der Daten ist als schwarze durchgezogene Linie dargestellt.

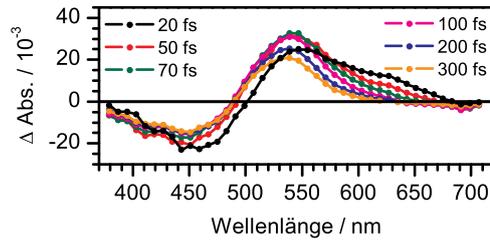


**Abbildung 8.4:** Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 ohne Belichtung (●) und unter Dauerbelichtung (○). Die Transienten zeigen den Bereich des Grundzustandsbleichens (446 nm) und der Absorption des angeregten Zustands sowie des Photoprodukts (550 nm). Der globale Fit der ohne Belichtung aufgenommenen Daten ist als schwarze durchgezogene Linie dargestellt.

Von dem archaealen Retinalprotein BR war bekannt, dass im Grundzustand ein Gleichgewicht aus der dunkel- und der lichtadaptierten Spezies vorliegt [16, 21]. Es zeigte sich, dass beide Zustände unterschiedliche Photozyklen durchlaufen [317–322]. Um die Möglichkeit unterschiedlicher Isomerisierungsrichtungen für ChR-2 zu überprüfen wurden zusätzlich transiente Absorptionsmessungen unter Dauerbelichtung durchgeführt. Wie in Abbildung 8.4 dargestellt zeigen die Datensätze nur minimale Abweichungen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Lichtadaption zumindest auf die Primärdynamik keinen signifikanten Einfluss hat. Im Folgenden werden daher nur die Daten nach Anregung bei 480 nm ohne Dauerbelichtung im Detail diskutiert. Abbildung 8.5 gibt einen Überblick über die beobachteten transienten Absorptionsänderungen nach Photoanregung. Blau sind hierbei negative Absorptionsänderungen dargestellt, rot positive Differenzbanden. In grün eingefärbte Bereiche weisen keine signifikanten Absorptionsänderungen auf. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear skaliert, hiernach logarithmisch.

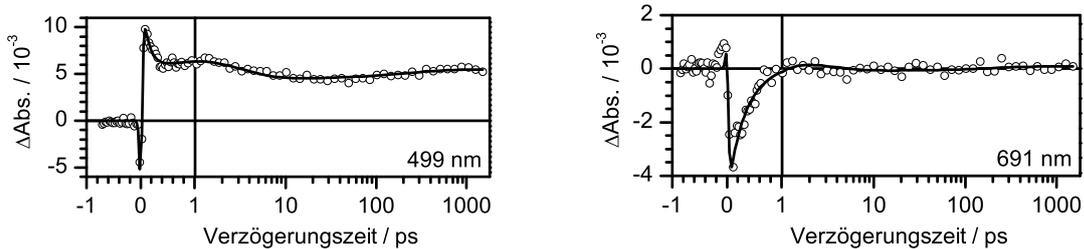


**Abbildung 8.5:** Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 nach Photoanregung bei 480 nm. Die Hauptbeiträge entsprechen dem Grundzustandsbleichen, einer Überlagerung aus der Absorption des angeregten Zustands (frühe Verzögerungszeiten) und des Photoprodukts sowie der stimulierten Emission.



**Abbildung 8.6:** Transiente Spektren zu sehr kurzen Verzögerungszeiten von ChR-2. Eine dominante Blauverschiebung des angeregten Zustands wird beobachtet.

Am blauen Ende des Spektrums ist die negative Absorptionsänderung des ausgebleichten Grundzustands zu erkennen. Das beobachtete Signal zerfällt innerhalb einiger Pikosekunden und erreicht wie in den Abbildungen 8.3 und 8.4 zu sehen ist bei Verzögerungszeiten  $\geq 10$  ps einen konstanten Offset von wenigen mOD. Die Absorption des angeregten Zustands ist direkt nach Photoanregung in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 650 nm zu beobachten. Die positive Signatur schiebt in den ersten 150 fs stark zu kürzeren Wellenlängen (siehe Abbildung 8.6) und zerfällt danach mit Zeitkonstanten von wenigen hundert Femtosekunden sowie ca. 3 ps. Exemplarische Einzeltransienten sind in den Abbildungen 8.3 und 8.4 rechts geplottet. Bei Verzögerungszeiten  $\geq 10$  ps bleibt schlussendlich die positive Absorption des Photoprodukts übrig. Bei langen Verzögerungszeiten ist noch eine Dynamik mit kleiner Amplitude zu erkennen (Siehe 8.7). Oberhalb von 650 nm ist die negative Absorptionsänderung der stimulierten Emission erkennbar. Diese Bande entsteht innerhalb der Zeitauflösung und zerfällt wie Abbildung 8.7 zeigt mit einer Zeitkonstante von  $< 500$  fs. Die Amplitude dieses Signals ist sehr klein. Dies ist aber nicht verwunderlich, da die Transiente im langwelligeren Bereich des Fluoreszenzspektrums angesiedelt ist (siehe Abbildung 8.2) und daher der überwiegende Teil der stimulierten Emission von der Absorption des angeregten Zustands sowie des Photoprodukts überdeckt ist.

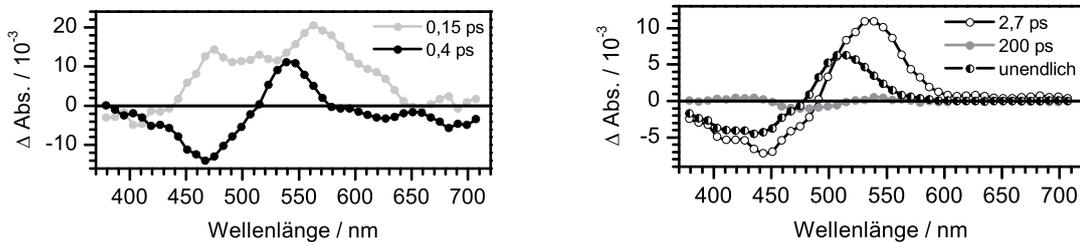


**Abbildung 8.7:** Transiente Absorptionsänderungen (○) von ChR-2 bei 499 nm und 691 nm. Die Beiträge des Photoprodukts, das bei frühen Verzögerungszeiten von der Absorption des angeregten Zustands überlagert ist, sowie der stimulierten Emission sind dargestellt. In schwarz ist der globale Fit der transienten Absorptionsmessungen gezeigt.

	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_4$ / ps	$\tau_\infty$
Transiente Absorption	0,15	0,4	2,7	200	unendlich
Fluoreszenz	-	0,4	-	-	-

**Tabelle 8.1:** Erhaltene Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten im sichtbaren Spektralbereich sowie der Anpassung der Fluoreszenz-Aufwärtskonvertierungsmessung bei 520 nm. Der Wert der Zeitkonstante  $\tau_2$  stimmt für beide Experimente überein.

Für die weitere Evaluation wurden die ermittelten transienten Absorptionsänderungen einer globalen Fitanalyse unterzogen. Diese ergab, dass die Daten mit fünf Zeitkonstanten zufriedenstellend angepasst werden können. Eine Auflistung der Zeitkonstanten ist in Tabelle 8.1 gegeben. Die zerfallassozierten Spektren sind in Abbildung 8.8 gezeigt. Die kürzeste Zeitkonstante  $\tau_1$  liegt im Bereich der Zeitauflösung und kann daher durch unkorrigierte Reste von kohärenten Artefakten beeinflusst werden. Auch oszillatorische Effekte können nicht ausgeschlossen werden. Jedoch zeigen die Rohdaten in diesem Zeitbereich eine verlässliche Dynamik, sodass diese Zeitkonstante keinem unphysikalischen Prozess zugeordnet zu sein scheint. Die zwischen 450 nm und 650 nm beobachtete breite positive Amplitude im zerfallassozierten Spektrum von  $\tau_1$  spiegelt die dominante Blauverschiebung auf ultraschneller Zeitskala als Abnahme der positiven induzierten Absorption wider. Die leicht negative Amplitude bei kürzeren Wellenlängen zeigt analog den beobachteten schnellen Zerfall im Bereich des Grundzustandsbleichens. Das zerfallassozierte Spektrum der nachfolgenden Zeitkomponente  $\tau_2$  weist eine negative Signatur im Bereich der Grundzustandsabsorptionsbande auf. Der Prozess muss daher einem Grundzustands-Rückkehrpfad zugeordnet sein. Der weitere Verlauf des Amplitudenspektrums zeigt, dass dieser Pfad direkt dem ersten angeregten Zustand entspringt, da die positive Signatur zwischen 520 nm und 570 nm dem Zerfall der Absorption des angeregten Zustands und die negativen Amplituden bei Abtastwellenlängen  $> 600$  nm dem Rückgang der stimulierten Emission zugeschrieben wird. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_3$  zeigt ebenfalls eine negative Signatur im Bereich der Absorption des Grundzustandes und

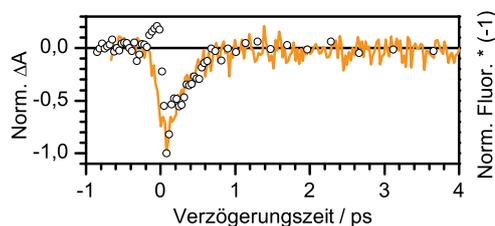


**Abbildung 8.8:** Zerfallassozierte Spektren der globalen Fitanalyse von ChR-2 mit fünf Zeitkonstanten. Die Amplitudenspektren der ersten beiden Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  sind in der linken Abbildung gegeben, die der langsameren drei Zeitkomponenten in der rechten Abbildung.

rotverschoben hierzu eine positive Bande, weist aber nicht die negative Amplitude, die dem Rückgang der stimulierten Emission zugeordnet wurde, auf. Der Prozess kann daher nicht einem  $S_1$ -Deaktivierungspfad entsprechen. Die starke Übereinstimmung der Amplitudenspektren von  $\tau_3$  und  $\tau_\infty$ , das dem Photoprodukt Differenzspektrum entspricht, lässt vermuten, dass der Zerfall der heißen Grundzustandspopulationen in der all-*trans*- und 13-*cis*-Retinal-Konfiguration beschrieben wird. Das zerfallassozierte Spektrum von  $\tau_4$  weist im kompletten Wellenlängenbereich lediglich eine sehr geringe Amplitude auf. Die beobachtete positiv-negativ-positiv-Signatur deutet auf eine Veränderung der Bandenbreite des Produkts hin.

### Fluoreszenzaufwärtskonvertierung

Um tiefere Einblicke in die Deaktivierung des angeregten Zustands zu bekommen, wurde ein Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsexperiment durchgeführt. Hierdurch kann direkt auf die Lebensdauer des angeregten Zustands geschlossen werden. Die Messungen können zudem mit den transienten Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich korreliert werden. Die Anregungswellenlänge lag im vorliegenden Fall bei 415 nm. Detektiert wurde eine Fluoreszenzwellenlänge von 520 nm. Der erhaltene transiente Datensatz ist in Abbildung 8.9 dargestellt. Eine Überlagerung der Fluoreszenzabklingkurve mit dem zeitlichen Verlauf der stimulierten Emission bei 691 nm zeigt eine sehr gute Übereinstimmung. Zur Analyse wurde die Fluoreszenztransiente mit einer mono- sowie einer biexponentiellen Zerfallsfunktion angepasst. Ein Exponentialzerfall mit einer Zeitkonstante von 0,4 ps beschreibt dabei die Fluoreszenzkinetik sehr gut. Eine Anpassung der Fluoreszenztransiente mit einer biexponentiellen Funktion liefert hingegen kein zufriedenstellendes Ergebnis. Die 0,4 ps Zeitkomponente ist zwar auch in diesem Fit erhalten, die zweite Zeitkonstante ist jedoch mit einem Wert von  $> 10$  ps größer als der beobachtete Zeitbereich. Diese Zeitkonstante modelliert daher lediglich das Rauschen bei Verzögerungszeiten  $> 1$  ps. Entsprechend diesem Ergebnis konnten also keine Anzeichen für die in den transienten Absorptionsmessungen gefundene Zeitkomponente von 2,7 ps gefunden werden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass diese Komponente mit dem Zerfall des angeregten Zustands assoziiert ist.



**Abbildung 8.9:** Gegenüberstellung der normierten zeitlichen Verläufe der stimulierten Emission bei 691 nm ( $\circ$ ) und der Fluoreszenz bei 520 nm (orange). Man erkennt eine gute Übereinstimmung der Datensätze.

## Diskussion und Interpretation der Primärdynamik

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Resultate der kurzzweitspektroskopischen Untersuchungen an ChR-2 anschaulich dargestellt. Transiente Absorptionmessungen im sichtbaren Spektralbereich stellten dabei heraus, dass die beobachtete Primärdynamik, die hauptsächlich aus der Isomerisierung des Retinals besteht, nahezu unabhängig von der Anregungswellenlänge ist. Kleine Abweichungen sind lediglich in den ersten 200 fs beobachtbar und können den unterschiedlichen Anregungsbedingungen, wie der Energie und der Pulsbreite, zugeordnet werden. Auf der einen Seite spricht dies gegen die Annahme, dass Heterogenitäten der Probe das strukturierte cw-Absorptionsspektrum hervorrufen. Die spektrale Signatur sollte daher einer Schwingungsfinestruktur zugeordnet werden können, wie man sie auch von Sensorrhodopsin II aus dem Organismus *Natronomonas pharaonis* kennt [316]. Auf der anderen Seite haben Retinalextraktionsexperimente und Resonanz Raman-Messungen an ChR-2 gezeigt, dass neben dem all-*trans*-Retinal auch ein signifikanter Teil (30%) 13-*cis*-Retinal vorliegt [315]. Meines Wissens nach sind die UV-vis-Spektren beider Isomere in ChR-2 bis heute nicht bekannt. Man kann daher nicht ausschließen, dass auch das *cis*-Isomer zwischen 400 nm und 550 nm absorbiert und in den durchgeführten Experimenten angeregt wird. Die beobachtete Dynamik könnte daher auch partiell zu einem 13-*cis*-Photozyklus gehören. Studien von Hegemann et al. legen jedoch nahe, dass eine all-*trans* nach 13-*cis*-Isomerisierung im der Aktivierungsmechanismus von ChR-2 stattfindet [323]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Primärdynamik nicht durch eine mögliche Licht/Dunkeladaption beeinflusst wird. Dieses Ergebnis stimmt mit den Schlussfolgerungen von Nack et al. überein [315].

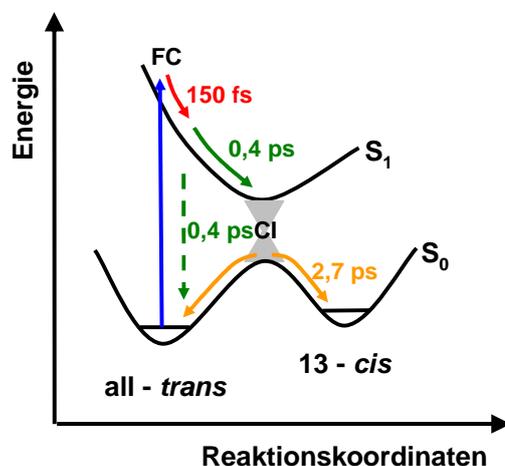
Die Dynamik der ersten 1,5 ns lässt sich nach obigen Erkenntnissen wie folgt beschreiben und interpretieren: Während der ersten 150 fs nach Photoanregung beobachtet man eine Blauverschiebung und Verschmälerung der Absorption des angeregten Zustands. Weitere Beiträge in diesem Zeitfenster sind zudem Wellenpakets-ähnliche oszillatorische Effekte sowie unkorrigierte Reste des kohärenten Artefakts. Da sich diese Beiträge zeitlich überlagern, können sie nicht in der globalen Analyse separiert werden. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  kann daher nicht einem einzelnen molekularen Prozess zugeschrieben werden. Eine Zuordnung zu einer Bewegung auf dem ersten angeregten Zustand ist aber sehr wahrscheinlich. In diesem Fall würde die beobachtete Blauverschiebung einer ultraschnellen Schwingungsrelaxation der heißen  $S_1$ -Population entsprechen. Dieser Prozess ist bereits für das bakterielle Retinalprotein PR sowie das archaeale BR in der Literatur bekannt. Zeitaufgelöste Fluoreszenzstudien dieser Proteine weisen eine ultraschnelle Stokes-Verschiebung während der ersten 100 fs - 200 fs auf [173, 273]. In transienten Absorptionmessungen an PR wird dies in einer wellenlängen-abhängigen Verzögerung der stimulierten Emission sichtbar [273, 279]. Für BR wird diese Verzögerung hingegen nicht beobachtet [198, 324, 325]. Statt dessen erwies die Analyse der stimulierten Emission [165] sowie der Fluoreszenzdynamik eine Zerfallskomponente im Bereich von etwa 150 fs [171–173].

Für ChR-2 konnte in dieser Studie jedoch weder eine Verzögerung noch eine 150 fs-Zerfallskomponente der stimulierten Emission beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich

darauf zurückzuführen, dass diese Bande von der Absorption des angeregten Zustands überlagert wird [198]. Zudem kann ein strahlender  $S_1$ - $S_0$ -Übergang in diesem Zeitbereich auch ausgeschlossen werden, da die transienten Spektren zu frühen Verzögerungszeiten nur geringe Beiträge der Rückkehr des Grundzustandsbleichens verzeichnen.

Prinzipiell sollte es mittels Fluoreszenzspektroskopie möglich sein, die Prozessen der ersten Pikosekunden nach Anregung aufzuklären. Mit einer Zeitauflösung von 150 fs konnte die gezeigte Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsmessung leider nicht viel zur Aufklärung beitragen. Weitere Kerr-Shutter-Fluoreszenzexperimente sind jedoch geplant, die tiefere Einblicke in diese Fragestellung geben werden.

Die nun relaxierte Population des angeregten Zustands zerfällt monoexponentiell mit 0,4 ps und populierte damit den isomerisierten Photoproduktzustand, der in Analogie zum archaealen BR im Folgenden K-Zustand genannt wird. Da die Isomerisierungsquantenausbeute in ChR-2 analog zu BR  $< 1$  sein sollte [157, 175, 326–328], wird auch ein Rückgang des Grundzustandsbleichens mit dieser Zeitkonstante beobachtet. Diese monoexponentielle Deaktivierung des angeregten Zustands konnte auch durch das Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsexperiment validiert werden. Eine exponentielle Anpassung des zeitlichen Fluoreszenzverlaufs resultiert in einer Zeitkonstante von 0,4 ps, ein Wert, der in exzellenter Übereinstimmung mit der Komponente  $\tau_2$  der transienten Absorptionsdaten ist. Die heiße Grundzustandpopulation thermalisiert anschließend in einem Kühlprozess (2,7 ps) und bevölkert damit wiederum sowohl den all-*trans*-Ausgangszustand als auch das relaxierte 13-*cis*-Photoprodukt. Die 2,7 ps-Komponente konnte im Fluoreszenzexperiment nicht beobachtet werden, was für die gegebene Zuordnung spricht.



**Abbildung 8.10:** Schematische Darstellung der Primärreaktion von ChR-2. Die den Zeitkonstanten zugeordneten Prozesse sind in farblich kodierten Pfeilen dargestellt.

Die große Ähnlichkeit zur Primärdynamik von BR, speziell die annähernde Übereinstimmung der Zeitkonstanten, legt die Vermutung nahe, dass die Triebkräfte der Retinalisomerisierung also die Elektrostatik, das Wasserstoffbrückennetzwerk sowie die

Geometrie der Bindetasche denen im BR sehr ähnlich sind. Die Primärdynamik von ChR-2 kann daher unter Bezugnahme der publizierten Isomerisierungsmodelle diskutiert werden (Siehe hierfür Kapitel 6). Für BR konnte gezeigt werden, dass die hochfrequente C=C-Streckmode die Franck-Condon-aktive Mode ist [329]. Die Prozesse auf einer 100 fs - 200 fs-Zeitskala werden daher meist der Relaxation der C=C-Streckschwingung des Retinals im angeregten Zustand zugeschrieben. Die intramolekularen Energieaustauschprozesse zwischen den Schwingungsmoden sollen die Hauptrolle der nachfolgenden Dynamik spielen. Neben der niederfrequenten Torsionsmode sind noch weitere hochfrequente Moden, wie bspw. die HOOP-Mode (engl.: hydrogen out of plane) in die Isomerisierung involviert [195]. Mit etwa 500 fs wird die Bildung des rot-verschobenen J-Intermediats beobachtet [165, 180, 198, 324]. Der J-K-Übergang findet mit 3 ps - 5 ps statt [157, 175, 180].

Die Primärreaktion schließt mit kleineren Änderungen der Bandenbreite der Produktsignatur mit der Zeitkonstante  $\tau_4$ . Diese Änderungen sind jedoch plausibel, da schon das FTIR-Differenzspektrum bei 80 K im Bereich der Amid I-Schwingung große Signale zeigt [313], die auf (lokale) Änderungen der C=O-Oszillatoren des Peptidrückgrats hinweisen. Diese sollten sich auch auf das Absorptionsspektrum des Chromophors auswirken. Wie Messungen der NpSR II D75N-Mutante gezeigt haben (Siehe Kapitel 9.2 bzw. [330]), kann auch der Zusatz von externen Donoren wie Azid einen Einfluss auf die Dynamik bei langen Verzögerungszeiten ( $> 100$  ps) haben. Da die vorliegenden Messungen an einer ChR-2-Probe durchgeführt wurden, die 500 mM Imidazol enthält, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der mit  $\tau_4$  beobachtete Prozess eine Konsequenz des im Puffer enthaltenen Imidazols ist. Das transiente Spektrum nach 1,5 ns weist das bei Retinalproteinen deutlich rotverschobene K-Photoprodukt (510 nm) auf. Schwingungsspektroskopie konnte zeigen, dass das Retinal mit Erreichen dieses Zustands eine all-*trans* nach 13-*cis* Isomerisierung vollzogen hat [313, 315].

### 8.3 Ultraschnelle Dynamik im infraroten Spektralbereich

Um weitere Einblicke in die Photodynamik nach Anregung zu bekommen, wurden transiente Absorptionmessungen im mittelinfraroten Spektralbereich durchgeführt. Neben den Änderungen der Chromophorschwingungen können hierdurch auch durch die Isomerisierung hervorgerufene Veränderungen der Proteinstruktur beobachtet werden. Dies ist im vorliegenden Fall von erhöhtem Interesse, da Tieftemperatur-FTIR-Spektroskopie charakteristische Differenzbanden im Amid I-Bereich auflösen konnte, die konformationellen Proteinänderungen während der Bildung des K-Intermediats zugeordnet wurden [313].

#### Experimentelle Vorgehensweise

Die für die Messungen benutzten solubilisierten ChR-2-Proben wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bamberg, MPI für Biophysik, Universität Frankfurt, bereitgestellt. Eine Beschreibung der Proteinextraktion sowie der Aufreinigungsprozedur findet man

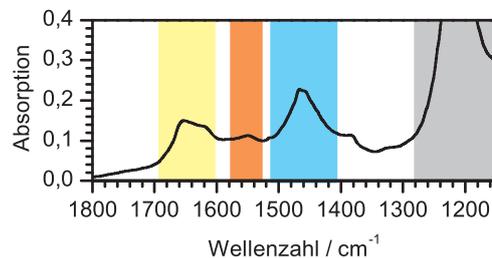
in nachfolgender Referenz [331]. Aufgrund der hohen Absorption des Wassers im mittelinfraroten Spektralbereich, wurden die Messungen in D<sub>2</sub>O durchgeführt. Um einen möglichst guten Austausch zu gewährleisten wurde die Probe vier Tage in D<sub>2</sub>O-Puffer (20 mM HEPES, pD 7,4, 0,2 % DM, 100 mM NaCl) gelagert. Die Aufkonzentrierung der Probe wurde über Zentrifugalfiltrierung (Centriprep, 50 kD cut-off, Millipore) realisiert. Die Konzentration wurde auf eine optische Dichte von etwa 0,15 bei 50  $\mu\text{m}$  Schichtdicke im sichtbaren Absorptionsmaximum eingestellt.

Die transienten Absorptionsmessungen wurden mit dem in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Aufbau durchgeführt. Die Anregungswellenlänge wurde über die Summenfrequenzerzeugung zwischen NOPA-Pulsen und der Laserfundamentalen auf 430 nm eingestellt. Die Pulsenergie lag etwa bei 400 nJ. Das Abtastlicht im infraroten Spektralbereich wurde über die beschriebenen nichtlinearen Konversionsprozesse generiert. Für den in Abbildung 8.12 dargestellten Abtastbereich mussten drei sich mit jeweils zwei Kanälen überlappende Messungen zwischen etwa 1450  $\text{cm}^{-1}$  und 1520  $\text{cm}^{-1}$ , 1520  $\text{cm}^{-1}$  und 1585  $\text{cm}^{-1}$  sowie 1585  $\text{cm}^{-1}$  und 1680  $\text{cm}^{-1}$  durchgeführt werden. Anreg- und Abtastpulse waren dabei im magischen Winkel polarisiert. Es wurde eine Zeitauflösung von etwa 300 fs erreicht. Der Probenaustausch zwischen zwei Laserpulsen wurde durch Rotation und gleichzeitige Translation der Probe gewährleistet.

## IR Absorptionsspektroskopie

Abbildung 8.11 zeigt das IR-Absorptionsspektrum der für die Kurzzeitmessungen benutzten Probe, das in einer Grabenküvette mit einer optischen Weglänge von 10  $\mu\text{m}$  aufgenommen wurde. Die charakteristischen Protein- und Lösungsmittelabsorptionsbanden erlauben eine grobe Bestimmung des Deuterierungsgrads der Probe. Um 1200  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet man die intensive Schwingungsbande ( $\delta$ ) des hauptsächlich vorliegenden Lösungsmittels D<sub>2</sub>O (grau). Durch den Austausch mit dem in der Luft enthaltenen Wasser oder Protonen des Proteins liegt auch immer ein gewisser Anteil an HDO vor (blau). Dieser ist im Spektrum bei etwa 1460  $\text{cm}^{-1}$  zu finden.

Überlagert wird diese Bande von der Amid II' Bande des Proteins. Die Charakteristik um 1550  $\text{cm}^{-1}$  kann der Amid II-Bande nicht-ausgetauschter Peptidbindungen

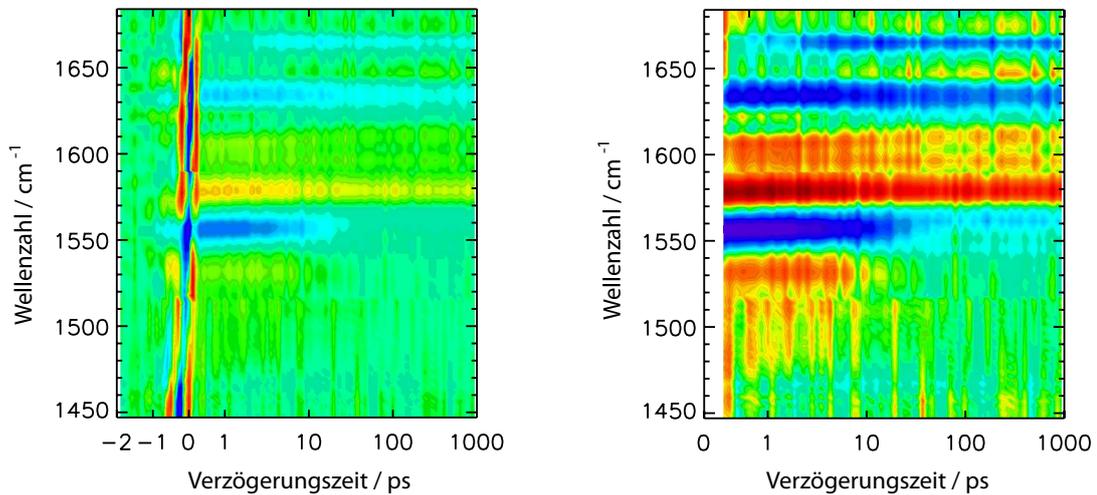


**Abbildung 8.11:** IR-Absorptionsspektrum von solubilisiertem ChR-2 in D<sub>2</sub>O. Die Protein- und Lösungsmittelbanden sind farblich markiert. grau = D<sub>2</sub>O, blau = HDO und Amid II', orange = Amid II, gelb = Amid I

zugeordnet werden (orange). Dies belegt, dass es für das Lösungsmittel unzugängliche Bereiche im Protein gibt. Die breite Bande um  $1650\text{ cm}^{-1}$  kann der Amid I-Proteinbande deuterierter und nicht-deuterierter Peptidbindungen zugeordnet werden (gelb). Beiträge der Pufferbestandteile sind auch nicht auszuschließen.

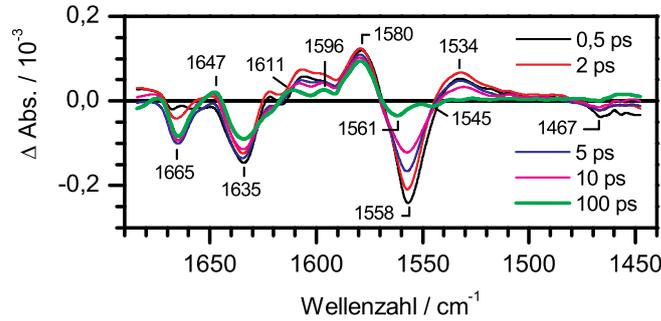
### Transiente Absorptionsmessungen im infraroten Spektralbereich

Abbildung 8.12 gibt einen Überblick über die transienten Absorptionsänderungen von ChR-2 im Bereich von  $1450\text{ cm}^{-1}$  bis  $1690\text{ cm}^{-1}$  nach Anregung bei  $430\text{ nm}$ . Die Absorptionsänderungen sind in dieser Darstellung farblich kodiert. Rote Bereiche geben positive Absorptionsänderungen an, blaue Bereiche negative Absorptionsänderungen und in grün-eingefärbten Bereichen sind keine Absorptionsänderungen zu beobachten. Die x-Achse ist von  $-2$  bis  $1\text{ ps}$  linear skaliert und wird hiernach logarithmisch weiter geführt. Effekte vor dem Zeitnullpunkt sind auf den gestörten freien Induktionszerfall zu-



**Abbildung 8.12:** Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen von ChR-2 im Bereich von  $1450\text{ cm}^{-1}$  bis  $1690\text{ cm}^{-1}$  nach Anregung bei  $430\text{ nm}$ . Hauptbeiträge stammen von der C=C- und C=N-Streckschwingung des Retinals. Weitere photoinduzierte Differenzbanden sind wahrscheinlich auf die Änderungen der Aminosäure-Seitenketten- bzw. Amid-Schwingungen zurückzuführen.

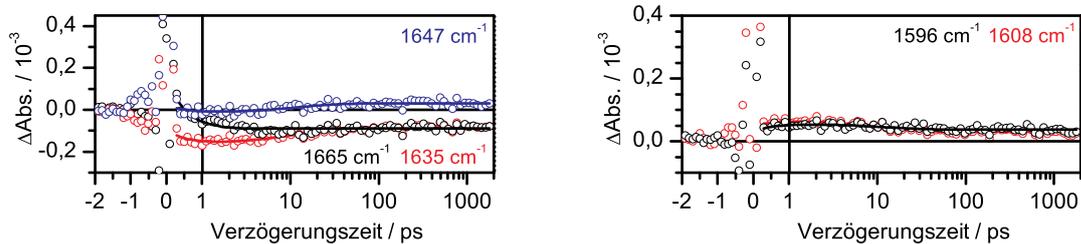
rückzuführen, während das Signal um  $t_D=0$  durch die Kreuzphasenmodulation zwischen Anreg- und Abtastpuls bestimmt wird. Da der Farbcode auf das höchste und niedrigste Signal skaliert wird und dieses im vorliegenden Fall durch die Kreuzphasenmodulation gegeben ist, ist in Abbildung 8.12 zusätzlich eine Graphik gegeben, in der die transienten Absorptionsänderungen ab  $0,3\text{ ps}$  gezeigt sind, also nur photoinduzierte Differenzbanden dargestellt sind. Wie Abbildung 8.13 zeigt sind eine Vielzahl an positiven und negativen Differenzbanden im beobachteten Zeitraum erkennbar, die unterschiedliche Dynamik aufweisen. Die Ergebnisse sollen daher im ersten Schritt mit abfallender Energie der Bandenposition präsentiert werden.



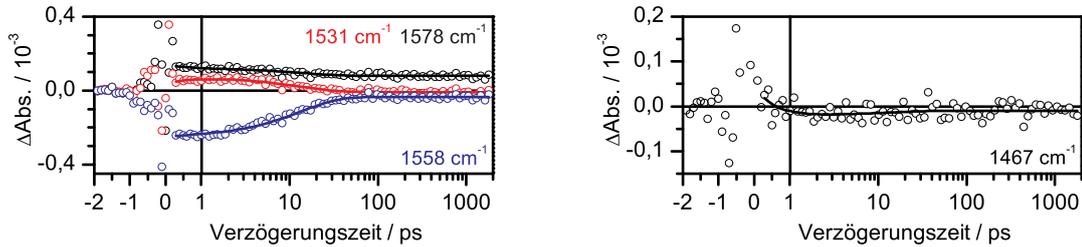
**Abbildung 8.13:** Transiente Spektren von ChR-2 zu ausgewählten Verzögerungszeiten. Das Spektrum bei 100 ps (grün koloriert) entspricht dem Spektrum am Ende des Observationszeitraum von 1,8 ns.

Um  $1665\text{ cm}^{-1}$  ist eine negative Absorptionsbande erkennbar. Diese bildet sich auf einer sub-Pikosekunden-Zeitskala und besitzt danach eine nahezu konstante Amplitude von  $0,1 \times 10^{-3}$ . Rot- und blau-verschoben hierzu beobachtet man schwach positive Signaturen. Eine weitere negative Absorptionsbande befindet sich bei  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Das Signal wird direkt mit der Anregung gebildet, fällt die erste Pikosekunde leicht ab und nimmt danach mit einer Zeitkonstante von etwa 10 ps geringfügig zu. Da die Bande bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  eindeutig einen gestörten freien Induktionszerfall aufweist, ist sie einer gebleichten Grundzustandsschwingung zuzuordnen. Um  $1600\text{ cm}^{-1}$  ist bei kurzen Verzögerungszeiten eine positive Absorptionsbande beobachtbar, die sich im Zeitverlauf in zwei Banden aufspaltet, die jeweils leicht blau bzw. rot schieben. Die Überlagerung einer negativen Bande scheint eine wahrscheinliche Erklärung für den beschriebenen Verlauf zu sein. Am Ende der Observationszeit ist aber keine negative Bande erkennbar. Die Maxima der positiven Banden sind bei  $1596\text{ cm}^{-1}$  und  $1608\text{ cm}^{-1}$  zu finden (Abbildung 8.14).

Das größte positive Signal des untersuchten Spektralbereichs wird um  $1580\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Wie die transiente Absorptionsänderung bei  $1578\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 8.15 zeigt, ist eine positive Absorptionsänderung von etwa  $0,15 \times 10^{-3}$  direkt nach der Kreuz-



**Abbildung 8.14:** Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 bei  $1565\text{ cm}^{-1}$  (○),  $1647\text{ cm}^{-1}$  (○) und  $1635\text{ cm}^{-1}$  (○), sowie bei  $1608\text{ cm}^{-1}$  (○) und  $1596\text{ cm}^{-1}$  (○). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die zugehörigen Fits. Die y-Achse ist so skaliert, dass die photoinduzierten Absorptionsänderungen optimal erkennbar sind. Hierdurch wurden aber Teile der Kreuzphasenmodulation abgeschnitten.



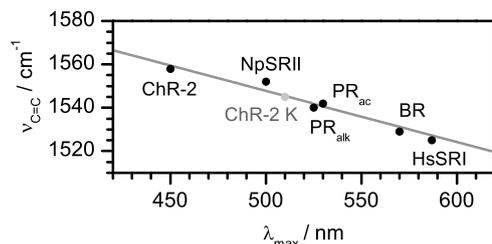
**Abbildung 8.15:** Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 bei  $1467\text{ cm}^{-1}$  ( $\circ$ ), sowie im Bereich der C=C-Streckschwingung bei  $1578\text{ cm}^{-1}$  ( $\circ$ ),  $1558\text{ cm}^{-1}$  ( $\circ$ ) und  $1531\text{ cm}^{-1}$  ( $\circ$ ). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die zugehörigen Fits. Die y-Achse ist so skaliert, dass die photoinduzierten Absorptionsänderungen optimal erkennbar sind. Hierdurch wurden aber Teile der Kreuzphasenmodulation abgeschnitten.

phasenmodulation zu sehen. Der weitere Zeitverlauf weist lediglich eine geringfügige Zerfallskomponente auf einer 10 ps Zeitskala auf. Um  $1558\text{ cm}^{-1}$  ist eine stark negative, breite Differenzbande erkennbar. Die transienten Spektren in Abbildung 8.13 zeigen, dass die Bande auf einer 10 ps Zeitskala zerfällt und schmaler wird, wobei sich zwei Banden mit Zentralwellenlängen von  $1545\text{ cm}^{-1}$  und  $1561\text{ cm}^{-1}$  herausbilden. Der gestörte freie Induktionszerfall bei  $1555\text{ cm}^{-1}$  zeigt, dass mindestens eine dieser Banden einer Grundzustandsschwingung zugeordnet werden muss. Rotverschoben zu den negativen Banden ist eine positive Absorptionsänderung bei  $1531\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Sie besitzt die gleiche temporale Charakteristik wie die Bleichbande. Angeschlossen an diese Bande ist ein breiter ( $1470\text{ cm}^{-1}$  -  $1520\text{ cm}^{-1}$ ), positiver Absorptionsbeitrag mit geringer Amplitude, der mit einer 10 ps Komponente zerfällt. An der niederfrequenten Flanke des beobachteten Spektralbereichs wird zudem noch ein ebenfalls sehr geringes negatives Signal um  $1467\text{ cm}^{-1}$  beobachtet (siehe Abbildung 8.15), das mit einer sub-Pikosekunden Zeitkonstante gebildet wird und danach nahezu konstant ist.

### **Bandenzuordnung**

Da die infrarotspektroskopischen Untersuchungen an ChR-2 erst am Anfang stehen, sind in der Literatur bis jetzt nur einige ausgewählte Schwingungsbanden zugeordnet worden. Erschwert wird das ganze zusätzlich durch die Verschiedenheit der FTIR-Differenzspektren von ChR-2 und BR, sodass Analogieschlüsse nur in geringem Maße möglich sind. Dennoch sollen im Folgenden mögliche Zuordnungen der in den Kurzzeitmessungen beobachteten Banden dargestellt werden. Diese Ausführungen sind aber nicht als vollständig zu betrachten, weitere Untersuchungen sind unabdingbar.

Die Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls bei  $1560\text{ cm}^{-1}$  zeigt, dass die größte negative Bande des beobachteten Differenzspektrums einer gebleichten Grundzustandsschwingung zuzuordnen ist. Die ausgeprägte Charakteristik dieser Bande in Resonanz-Raman-Messungen legt eine Zuordnung zur C=C-Streckschwingung des Retinalchromophors nahe [315]. Gestützt wird dies zusätzlich durch den linearen Zusammenhang

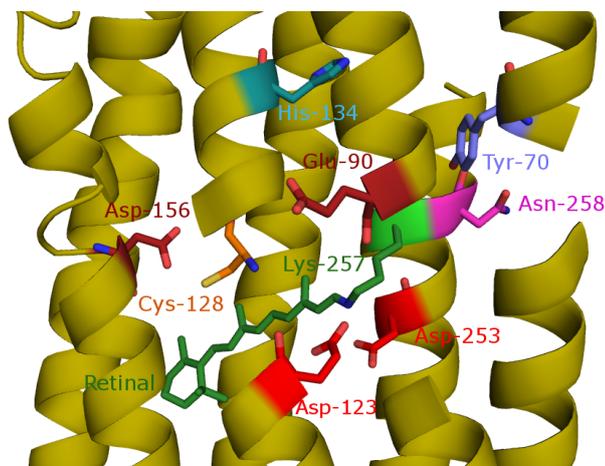


**Abbildung 8.16:** Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen sichtbarem Absorptionsmaximum des Retinalchromophors und der Wellenzahl der C=C-Streckschwingung einiger Retinalproteine.

zwischen dem Absorptionsmaximum des Chromophors im sichtbaren Spektralbereich und der Frequenz der C=C-Streckschwingung. Wie Abbildung 8.16 zeigt, ist für ChR-2 bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm eine Grundzustandsbleichbande um  $1560\text{ cm}^{-1}$  zu erwarten. Die K-Intermediat-Produktbande der C=C-Streckschwingung ist wie die Rotverschiebung des sichtbaren Absorptionsmaximums dieses Intermediats nahe bei kleineren Wellenzahlen zu finden. Berechnet man über die in Abbildung 8.16 gezeigte Gerade mit dem in Kurzzeitmessungen gefundenen K-Intermediat-Differenzspektrum (Vgl. Kapitel 8.2) die Wellenzahl des C=C-Produktbands, so erhält man hierfür einen Wert von etwa  $1550\text{ cm}^{-1}$ . Nach Anregung ist in diesem Bereich auch ein relativ breites positives Absorptionssignal erkennbar. Dieses ist aber am Ende des Observationszeitraums nicht mehr zu beobachten. Man findet aber genau an dieser Position eine kleine negative Differenzbande ( $(-)1545\text{ cm}^{-1}$ ). Hieraus kann gefolgert werden, dass das positive Signal der C=C-Streckschwingung des K-Intermediats von einer negativen Bande überlagert wird. Der Ursprung dieser negativen Bande ist wiederum nicht klar. Eine Zuordnung zu Amid II-Änderungen scheint im ersten Augenblick naheliegend. Da die Messungen aber in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt wurden und das IR-Absorptionsspektrum in Abbildung 8.11 darlegt, dass nur ein sehr geringer Teil der Peptidrückgratprotonen nicht-ausgetauscht vorliegen, sollte diese Bande keine allzu große Amplitude besitzen und die Überlagerung beider Banden somit nicht zur völligen Aufhebung der C=C-Produktbande führen.

Weitere Schwierigkeiten bereitet die Zuordnung der stark positiven Bande bei  $1580\text{ cm}^{-1}$ . Wie bereits oben beschrieben ist dieses Signal direkt nach Anregung beobachtbar und weist nur wenig Dynamik auf. Auch für diese Bande erscheint eine Verknüpfung mit der Amid II-Mode eher unwahrscheinlich, da der Hauptteil der Peptidgruppen deuteriert vorliegen sollte und die Amid II'-Mode, da sie von der N-D-Schwingung entkoppelt ist, um  $1475\text{ cm}^{-1}$  absorbieren sollte. Die Amplitude der Bande spricht weiterhin dafür, dass es sich nicht um die Änderung einer einzelnen Aminosäureseitenkette handelt.

Das Homologiemodell von ChR-2 zeigt jedoch eine Vielzahl an polaren Aminosäuren in der Bindetasche, wie beispielsweise die bei BR zum Protonenakzeptorkomplex gehörenden analogen Aminosäuren Glu-123 (BR: Asp-85) und Asp-253 (BR: Asp-212), der Protonendonator His-134 sowie Glu-90, Asn-258 und Tyr-70 in der direkten Nähe der Schiffbasenverknüpfung. Zudem sollte auch das mit Cys-128 wasserstoffverbrückte Asp-156 nicht unbeeinflusst von der Isomerisierung des Chromophors sein [332]. Wie



**Abbildung 8.17:** Durch Homologiemodelling an NpSR II (PDB-Datenbank: 1H68) vorhergesagte Struktur von ChR-2. Das Peptidrückgrad ist als Cartoon in gelb dargestellt, die polaren Aminosäuren um den Retinalchromophor (grün) sind im Stäbchenmodell farbig markiert. Zur besseren Darstellung sind die Helices teilweise nicht dargestellt.

Tabelle 8.2 zeigt, weisen diese Seitenketten alle Schwingungsbanden um  $1580\text{ cm}^{-1}$  auf.

Die Differenzbanden im sich anschließenden Bereich bis  $1615\text{ cm}^{-1}$  sind von zwei Banden dominiert, die mit zunehmender Beobachtungszeit ihre spektrale Lage ändern und nach 1,8 ns Maxima bei  $1611\text{ cm}^{-1}$  und  $1595\text{ cm}^{-1}$  aufweisen. Es ist naheliegend das beobachtete dynamische Verhalten mit der Überlagerung einer negativen Bande zu erklären. Auf Basis der derzeitigen Literatur können die beobachteten Banden jedoch nicht zugeordnet werden. Die kleinen Amplituden der Banden legen aber nahe, dass der Ursprung in der Störung oder Änderung einer Aminosäureseitenkette liegt. Neben den bereits in Tabelle 8.2 diskutierten hochfrequenten Schwingungen, kommen hierfür zudem die in Tabelle 8.3 dargestellten Schwingungen in Betracht.

Die negative Bande um  $1635\text{ cm}^{-1}$  kann wiederum aufgrund der eindeutigen Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls einer Grundzustandsschwingung zugeordnet werden. Auch in diesem Fall sind die Resonanz-Raman-Messungen zur Zuordnung sehr hilfreich. Nack et al. [315] zeigten, dass für ChR-2 in  $\text{H}_2\text{O}$  eine Bande bei  $1657\text{ cm}^{-1}$

	$\tilde{\nu}/\text{ cm}^{-1}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ )	$\tilde{\nu}/\text{ cm}^{-1}$ ( $\text{H}_2\text{O}$ )
Asp, $\nu_{as}(\text{COO}^-)$	1584	1574–1579
Glu, $\nu_{as}(\text{COO}^-)$	1567	1556–1560
Tyr-OH, $\nu(\text{CC})$	1590–1591	1594–1602
HisH, $\nu(\text{C} = \text{C})$	1569, 1575	1575, 1594

**Tabelle 8.2:** Charakteristische Aminosäureseitenkettenschwingungen um  $1580\text{ cm}^{-1}$ . Die angegebenen Werte sind der Publikation von Barth et al. [53] entnommen.

	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ (D <sub>2</sub> O)	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ (H <sub>2</sub> O)
Arg, $\nu_s(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$	1581–1586	1614–1663
Arg, $\nu_{as}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$	1605–1608	1652–1695
HisH <sub>2</sub> <sup>+</sup> , $\nu(\text{C}=\text{C})$	1600, 1623	1631
Tyr–OH, $\nu(\text{CC}), \delta(\text{CH})$	1612–1618	1614–1621
Tyr–O <sup>−</sup> , $\nu(\text{CC})$	1603	1599–1602

**Tabelle 8.3:** Charakteristische Aminosäureseitenkettenschwingungen um 1610 cm<sup>−1</sup>. Die angegebenen Werte sind der Publikation von Barth et al. [53] entnommen.

beobachtet wird, die der C=N-Schwingung der Schiffbase zugeordnet werden kann. Bei Deuterierung schiebt diese Bande auf 1629 cm<sup>−1</sup>, was charakteristisch für die starke Kopplung der C=N-Schwingung an die N-H-, bzw. N-D-Schwingung ist. Die in dieser Studie beobachtete negative Signatur bei 1635 cm<sup>−1</sup> kann daher auf das Ausbleichen der C=N-Schwingung zurückgeführt werden. Dies wird weiterhin durch die Tatsache unterstützt, dass diese Bande einen sehr ähnlichen Zeitverlauf wie die gebleichte C=C-Bande um 1560 cm<sup>−1</sup> aufweist.

Die Zuordnung des negativen Signals bei 1665 cm<sup>−1</sup> ist dagegen nicht eindeutig. Vor dem Zeitnullpunkt ist lediglich ein sehr schwaches negatives Signal erkennbar, das ebenso durch die oszillatorischen Signale des gestörten freien Induktionszerfalls der C=N-Schwingung hervorgerufen worden sein könnte. Es kann daher nicht eindeutig geklärt werden, ob die beobachtete Bande einer Grundzustandsschwingung zugeordnet werden kann. Wenn die Bande aber mit dem Chromophor verknüpft wäre, könnte eine Zuordnung zu der C=N-Schwingung undeutlierter Probe, [315] getroffen werden. Deutlich gegen eine solche Zuweisung spricht die beobachtete Dynamik. Der Vergleich der transienten Absorptionsänderungen bei 1665 cm<sup>−1</sup> mit den Änderungen der C=N- und C=C-Schwingung zeigt deutliche Unterschiede. Während die letztgenannten Banden direkt mit der Anregung entstehen, wird die Bande bei 1665 cm<sup>−1</sup> erst auf einer sub-Pikosekunden Zeitskala gebildet. Auch die nachfolgende Dynamik weist Unterschiede auf. Die beiden Grundzustandssignaturen zeigen starke Änderungen auf einer 10 ps-Zeitskala, während das Signal bei 1665 cm<sup>−1</sup> nach 2 ps konstant ist. Eine zweite Möglichkeit besteht zudem in der Zuordnung zu Differenzsignalen einer oder mehrerer Aminosäuren-Seitenketten. Hier wäre beispielsweise das in direkter Nachbarschaft zur Chromophorverknüpfung befindliche Asn-258 ein möglicher Kandidat. Laut Barth et al. [53] liegt die C=O-Schwingung von Asparagin und Glutamin in D<sub>2</sub>O bei etwa 1650 cm<sup>−1</sup>. Auch in Tieftemperatur-FTIR-Messungen wurde an dieser Position eine negative Differenzbande beobachtet [313]. Sie wurde dort einer Amid I-Änderung zugesprochen und als große strukturelle Änderungen des Proteins, d.h. der Bildung der Pore interpretiert. Die beobachtete Kurzzeitdynamik spricht gegen diese Interpretation, da große Helixbewegungen sicherlich nicht innerhalb von 500 fs von statten gehen können. Eine lokale Störung der Peptid-C=O-Oszillatoren in der Retinalbindetasche ist jedoch möglich. Stimmt diese Zuordnung, so sollte aber beim Auftreten einer dominanten Amid I-Mode auch die korrespondierende Amid II'-Mode eine

signifikante Amplitude aufweisen. Im zugehörigen Spektralbereich zwischen  $1450\text{ cm}^{-1}$  und  $1480\text{ cm}^{-1}$  ist zwar das Signal-zu-Rausch-Verhältnis etwas schlechter, es ist aber deutlich eine sich mit  $0,5\text{ ps}$  bildende negative Differenzbande bei  $1467\text{ cm}^{-1}$  beobachtbar. Diese könnte einer Änderung der Amid II'-Bande einer oder mehrerer Peptidgruppen in direkter Nähe zum Retinal zugeordnet werden. Die im Vergleich zum Signal bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  deutlich kleinere Amplitude dieser Bande, spricht aber eher gegen einen Zusammenhang beider Banden. Wobei man auch hier argumentieren könnte, dass durch die Entkopplung dieser Mode von der N-D-Schwingung die vermutlich sehr wichtige Sensitivität bezüglich Wasserstoffverbrückungen verloren geht und die Auswirkung auf diese Bande somit geringer sein sollte. Nicht zuletzt könnte die negative Bande bei  $1467\text{ cm}^{-1}$  zudem auch einer Änderung der in diesem Bereich absorbierenden HDO-Banden zugeordnet werden.

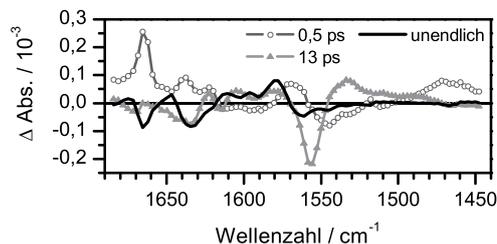
### Globale Fitanalyse

Zur Analyse wurden die transienten Absorptionsdaten einer globalen Fitanalyse unterzogen. Um die Effekte der Kreuzphasenmodulation nicht zu berücksichtigen, wurden die Daten ab Verzögerungszeiten von  $0,3\text{ ps}$  analysiert. Obgleich eine Vielzahl an Differenzbanden angepasst werden mussten, lassen sich die Datensätze optimal mit drei Zeitkonstanten fitten. Die Zerfallszeit  $\tau_1$  hat hierbei einen Wert von  $0,5\text{ ps}$  und  $\tau_2$  von  $13\text{ ps}$ . Für die letzte Zeitkonstante  $\tau_\infty$  wurde ein sehr großer Wert vorgegeben, der als konstantes Offset-Signal behandelt werden kann. Das zerfallassozierte Spektrum spiegelt daher das Differenzspektrum bei  $1,8\text{ ns}$  wider. Die drei Datensätze wurden sowohl einzeln als auch zusammen angepasst. Die Abweichungen der erhaltenen Zeitkonstanten waren dabei vernachlässigbar. Tabelle 8.4 fasst die erhaltenen Zerfallszeiten im Vergleich zu den ermittelten Werten der Ultrakurzzeitexperimente im sichtbaren Spektralbereich sowie der Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsdaten nochmals zusammen.

Abbildung 8.18 zeigt die zu den Zeitkonstanten zugehörigen zerfallassozierten Spektren. Die spektrale Charakteristik des Amplitudenspektrums von  $\tau_1$  kann wie folgt erklärt werden: Die breite positive Signatur zwischen  $1450\text{ cm}^{-1}$  und  $1500\text{ cm}^{-1}$  wird durch den leichten Anstieg des Signals in diesem Spektralbereich verursacht (Siehe Abbildung 8.13). Um  $1470\text{ cm}^{-1}$  ist ein leichter Einschnitt erkennbar, der sich auf die Bildung der negativen Bande in diesem Bereich zurückführen lässt, die wahrscheinlich mit der Amid II'-Mode verknüpft ist. Die negativen Banden bei  $1534\text{ cm}^{-1}$  und  $1545\text{ cm}^{-1}$  zeigen die Bildung schwingungsangeregter und damit rotverschobener C=C-Banden (all-*trans*-

	$\tau / \text{ps}$	$\tau / \text{ps}$	$\tau / \text{ps}$	$\tau_\infty$
IR	-	0,5	13	unendlich
vis	0,15	0,4	2,7	unendlich
Fluoreszenz	-	0,4	-	-

**Tabelle 8.4:** Vergleich der erhaltenen Zerfallszeiten der globalen Fitanalysen der transienten Daten von ChR-2.



**Abbildung 8.18:** Zerfallsspektren der Analyse der ChR-2-Daten im Infraroten.

sowie 13-*cis*-Retinal) an. Die Zeitkonstante hat ebenfalls einen Einfluss auf die negative Bleichbande dieser Schwingung. Die positive Amplitude bei  $1560\text{ cm}^{-1}$  korrespondiert mit dem in diesem Zeitbereich beobachteten weiteren Abfall des Signals. Im sich anschließenden Bereich besitzt das zerfallsspektren eine strukturierte negative Signatur. Diese kann dem weiteren Aufbau der unterschiedlichen positiven Banden in diesem Spektralbereich zugeschrieben werden. Im Bereich der C=N-Schwingung weist die positive Amplitude bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  auf den auch bei dieser Bande während der ersten Piko-sekunde beobachteten weiteren Abfall hin. Das stärkste Signal des Amplitudenspektrums von  $\tau_1$  ist bei  $(+)1665\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Dieses beschreibt den Aufbau der dominanten negativen Bande in diesem Bereich. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Prozess, der mit der Zerfallskomponente  $\tau_1$  verbunden ist, drei Hauptmerkmale aufweist. Zum einen zeigt sich, dass die negativen Differenzsignale der Grundzustandsbanden der C=C- und C=N-Schwingung mit dieser Zeit weiter abnehmen. Dies kann mit hoher Wahrscheinlichkeit dadurch erklärt werden, dass überlagerte positive Banden mit  $\tau_1$  zerfallen. Zum anderen ist die Bildung rotverschobener C=C- und C=N-Produktbanden mit diesem Vorgang verbunden. Als drittes werden zudem noch weitere positive wie negative Banden gebildet, die wahrscheinlich nicht den Schwingungen des Retinalchromophors zugeordnet werden können. Alle diese Prozesse können mit dem im sichtbaren Spektralbereich in diesem Zeitbereich beobachteten Zerfall des angeregten Zustands erklärt werden. Hierbei zeigen die Daten im infraroten Spektralbereich sowohl die K-Photoproduktbanden des isomerisierten Retinals wie auch die Auswirkungen auf die direkte Proteinumgebung.

Das zerfallsspektren von  $\tau_2$  weicht signifikant von dem Spektrum von  $\tau_1$  ab. Fast im gesamten Spektralbereich ist mit dieser Zeitkonstante ein leichter Rückgang der beobachteten positiven und negativen Signale verbunden. Besonders betroffen sind hierbei die gebleichten Grundzustandsbanden sowie die rotverschobenen Produktbanden der C=C-Streck- ( $(-)1555\text{ cm}^{-1}$ ,  $(+)1535\text{ cm}^{-1}$ ) und C=N-Streckschwingung ( $(-)1634\text{ cm}^{-1}$ ,  $(+)1622\text{ cm}^{-1}$ ). Man kann daher davon ausgehen, dass der zugrunde liegende Vorgang einem Kühlprozess entspricht, bei dem die Schwingungsenergie in niederfrequente Moden sowie das Lösungsmittel bzw. die Proteinumgebung abgegeben wird. Interessanterweise besitzt das zerfallsspektren von  $\tau_2$  gerade im Bereich der negativen Differenzbande bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  keine Amplitude, was bedeutet, dass diese Bande nicht vom beobachteten Wärmeeffekt beeinflusst wird. Eine Erklärung hierfür kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben werden.

## Fazit

Die im Bereich von  $1680\text{ cm}^{-1}$  bis  $1450\text{ cm}^{-1}$  durchgeführten Kurzzeit-IR-Messungen an ChR-2 zeigen, dass nach Anregung neben den Änderungen der charakteristischen C=C- und C=N-Schwingungen des Retinals eine Vielzahl an Differenzbanden sichtbar werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl den lokalen Peptidgruppen der Retinalbindetasche selbst wie auch den Seitenkettenschwingungen zugeschrieben werden können. Einige dieser Banden haben bereits nach Abklingen der Kreuzphasenmodulation eine relativ hohe Amplitude und weisen eine weitere Zunahme mit  $0,5\text{ ps}$  auf. Andere wie z.B. die negativen Banden bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  und  $1467\text{ cm}^{-1}$  werden erst mit dieser Zeitkonstante gebildet. Ein Vergleich mit den in Kapitel 8.2 beschriebenen transienten Absorptionmessungen im sichtbaren Spektralbereich sowie der Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsmessung macht deutlich, dass diese Zeitkonstante im Zeitbereich der Deaktivierung des angeregten Zustands liegt. Die IR-Daten zeigen daher eindrucksvoll, dass die Retinalbindetasche bei ChR-2 nicht nur auf eine sehr schnelle Isomerisierung ausgelegt ist, sondern die durch Anregung geschaffene Überschussenergie im Chromophor auch sehr effizient auf das Protein übertragen wird.

Mit Ausnahme der Bande bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  ist im beobachteten Spektralbereich nachfolgend ein Rückgang des Bandenmusters mit  $\tau_2 = 13\text{ ps}$  zu verzeichnen. Diese Zeitkonstante besitzt einen besonders großen Einfluss auf die C=C- sowie C=N-Streckschwingung des Retinals. Man kann daher davon ausgehen, dass die Komponente einen Kühlprozess beschreibt, bei dem die schwingungsangeregten Grundzustandspopulationen im *all-trans*-Ausgangszustand sowie im *13-cis*-Photoprodukt Energie an die Umgebung des Retinals, sprich das Protein und funktionelle Wassermoleküle, abgeben, was zur Absenkung der intramolekularen Temperatur führt. Die geringe Ausprägung der normalerweise mit diesem Prozess einhergehenden Verschiebungen der Bandenposition sowie der Änderung der Bandenbreite ist im Einklang mit der effizienten, schnellen Energieumverteilung.

Vergleicht man die beobachtete Dynamik im mittelinfraroten Spektralbereich mit der von PR (vgl. Kapitel 7.2), so erkennt man gravierende Unterschiede. Bei PR hat die lange Lebensdauer des angeregten Zustands zur Folge, dass es während der ersten  $30\text{ ps}$  unterschiedlichste schwingungsangeregte Populationen im angeregten Zustand sowie im  $S_0$ -Ausgangs- und Produktzustand gibt. Dies führt wiederum zur Überlagerung von unterschiedlich breiten, meist rotverschobenen Banden, die eine Zuordnung der einzelnen Schwingungen sowie der beobachteten Prozesse erschwert. Auch die Übertragung der Überschussenergie an das Protein scheint bei PR wesentlich weniger ausgeprägt, da Proteinbeiträge lediglich in Form kleiner Beiträge im Bereich der Amid I oder II Banden beobachtet werden. Die photophysikalischen Gegebenheiten in ChR-2 scheinen daher bestens geeignet um die Kopplung der Retinalisomerisierung an das Opsingerüst zu untersuchen. Eine umfangreiche Bandenzuordnung ist hierfür aber unabdingbar.

## 8.4 Die langsamen Schritte des ChR-2-Photozyklus und ihre Temperaturabhängigkeit

Die nachfolgenden Schritte des Photozyklus wurden mittels Laser-Blitzlichtphotolyse untersucht. Die hier vorgestellte Studie weist eine deutlich verbesserte Zeitauflösung von 200 ns auf, sodass der in bereits publizierten Messungen nur unzureichend beschriebene Zerfall des K-Intermediats nun ausführlicher charakterisiert werden konnte [309]. Um Einblicke in die Reaktionsbarrieren zu erlangen wurden zudem temperaturabhängige Messungen durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit Hilfe der Eyring-Theorie ausgewertet. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind ebenfalls in nachfolgend aufgeführter Publikation enthalten:

Verhoefen, M.-K., Bamann, C., Blöcher, R., Förster, U., Bamberg, E. and Wachtveitl, J., *The photocycle of channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps.*, (2010), *ChemPhysChem*, **11**: 3113-3122.

### Experimentelle Vorgehensweise

Blitzlichtphotolysemessungen wurden mit der in Kapitel 4.1 beschriebenen Apparatur durchgeführt. Die ChR-2 Probe wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bamberg hergestellt [331]. Sie war in 20 mM HEPES, pH 7,4, gepuffert und enthielt noch 0,1 % DM sowie 100 mM NaCl. Die optische Dichte lag bei einer Schichtdicke von 1 cm bei  $\approx 0,7$ . Um eine Vergleichbarkeit mit den in der Literatur bekannten Messungen zu erhalten, wurde eine Anregungswellenlänge von 480 nm gewählt. Die Pulsenergie lag am Probenort bei  $\approx 4 \text{ mJ/cm}^2$ . Der Laser wurde durch den intern im Laser angebrachten Shutter auf eine Repetitionsrate von 0,2 Hz eingestellt. Der Anregungspot hatte etwa einen Durchmesser von 0,8 mm, sodass fast das gesamte Probenvolumen in der 1 cm x 1 cm Quarzküvette angeregt wurde. Die Abtastung erfolgte in  $90^\circ$  zur Anregung. Die Abtastwellenlängen wurden von 390 nm bis 580 nm in 10 nm oder 20 nm Schritten gewählt. Die Weißlichtintensitäten wurden so gering gehalten, dass aktinische Effekte auszuschließen sind. Für jeden Scan wurden Datenpunkte zwischen -40 ms und 1,96 s mit einer Schrittweite von 200 ns aufgenommen. Es wurden jeweils 1000 Scans gemittelt. Die lineare Zeitachse der erhaltenen Datensätze wurde mit Hilfe eines Labview Programms zwischen  $+5 \mu\text{s}$  und 1,96 s in eine 200 Datenpunkte umfassende exponentielle Basis umgewandelt.

Für die temperaturabhängigen Messungen wurde die Küvettenhalterung über einen Thermostaten (Haake K20, Thermo Fischer) temperiert. Die Bedingungen für eine homogene Temperaturverteilung der Probe wurde mit einer Pufferlösung getestet und eine Temperaturgenauigkeit von  $0,2^\circ\text{C}$  abgeschätzt. Eine erste Messreihe wurde mit den oben beschriebenen experimentellen Bedingungen bei drei verschiedenen Abtastwellenlängen (390 nm, 440 nm und 520 nm) zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  in  $5^\circ\text{C}$  Schritten durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine temperaturabhängige Messreihe bei einer Abtastwellenlänge von 440 nm mit einer verlängerten Observationszeit von 10 s und einer Zeitauflösung

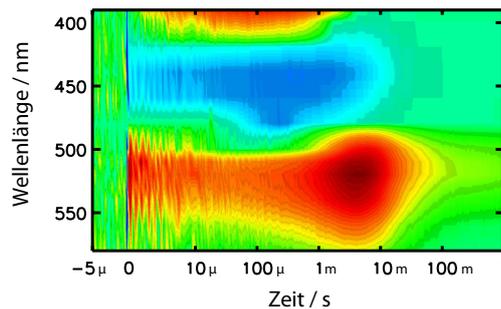
von 2 ms durchgeführt. Hierfür wurde die Repetitionsrate der Anregungspulse mit einem externen Shutter so verändert, dass die Probe alle 12 s angeregt wurde.

Die temperaturabhängigen Daten wurden für  $\tau \geq 1 \mu\text{s}$  über ein globales Fitprogramm angepasst. Die erhaltenen temperaturabhängigen Zeitkonstanten wurden unter Berücksichtigung der Eyringschen Formel (Siehe Kapitel 4.3) ausgewertet und die thermodynamischen Parameter bestimmt.

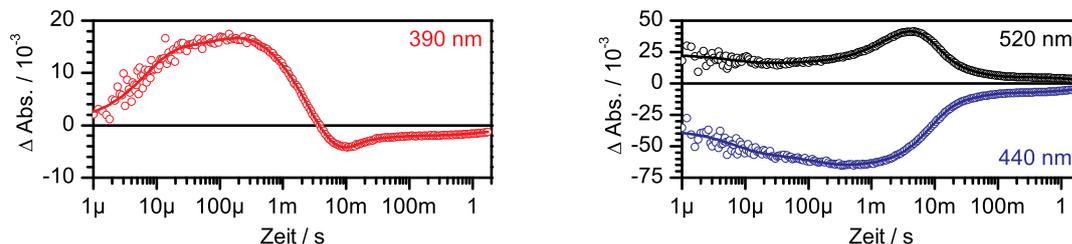
### Der Photozyklus bei Raumtemperatur

Abbildung 8.19 gibt einen Überblick über die lichtinduzierten Absorptionsänderungen von ChR-2 in einem Zeitbereich von  $-5 \mu\text{s}$  bis 1 s. Die Zeitachse ist bis  $10 \mu\text{s}$  linear skaliert, während sie danach logarithmisch weitergeführt wird. Blau kolorierte Regionen zeigen negative Absorptionsänderungen an, photoinduzierte Absorptionszunahmen sind rot gekennzeichnet. Die beobachtete negative Absorptionsbande um 450 nm kann dem Bleichen der angeregten all-*trans*-Retinal- Grundzustandspopulation zugeschrieben werden, während die hierzu blau- und rot-verschobenen positiven Differenzbanden durch die Absorption von Photoprodukten zustande kommen. Das Photoprodukt an der blauen Flanke des beobachteten Spektralbereichs, hier  $P_{390}$  genannt, ist lediglich zu frühen Zeiten erkennbar, die positive Absorptionsänderung um 520 nm hingegen während des ganzen beobachteten Zeitraums. Die Dynamik ist nach 1 s nicht vollständig abgeschlossen, da weiterhin ein geringes Differenzsignal erkennbar ist.

Der genaue Verlauf der drei spektral unterschiedlichen Regionen kann in den transienten Absorptionsänderungen der Einzelkanäle detaillierter verfolgt werden (Abbildung 8.20). Die Transiente bei 390 nm zeigt, dass das blau-verschobene Intermediat  $P_{390}$  durch zwei Zeitkomponenten aufgebaut wird. Die erste liegt im Bereich von etwa  $10 \mu\text{s}$ , die zweite um  $100 \mu\text{s}$ . Die maximale Amplitude wird bei etwa  $200 \mu\text{s}$  erreicht. Das Signal zerfällt nachfolgend mit einer Zeitkonstante im einstelligen Millisekundenbereich. Das am Ende der Observationszeit beobachtete negative Differenzsignal zeigt die gleiche Signatur wie das Grundzustandsbleichen (siehe Abbildung 8.20, rechts) und ist daher



**Abbildung 8.19:** Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 nach Photoanregung bei 480 nm in einem Zeitbereich von  $-5 \mu\text{s}$  bis 1 s. Die Zeitachse ist dabei bis  $10 \mu\text{s}$  linear skaliert, hiernach logarithmisch. Die Hauptbeiträge stammen von der Depopulierung des angeregten all-*trans*-Retinal-Zustands, sowie den im Photozyklus auftretenden blau- und rot-verschobenen Intermediaten.



**Abbildung 8.20:** Transiente Absorptionsänderung von ChR-2 nach Anregung bei 480 nm im Zeitbereich von  $1 \mu\text{s}$  bis 2 s. Die Transienten sind exemplarisch für die Beiträge des blau-verschobenen Photoprodukts (390 nm,  $\circ$ ), des Grundzustandsbleichens (440 nm,  $\circ$ ) der rotverschobenen Produkte (520 nm,  $\circ$ ) gewählt. Die durchgezogenen Linien repräsentiert jeweils den Fit.

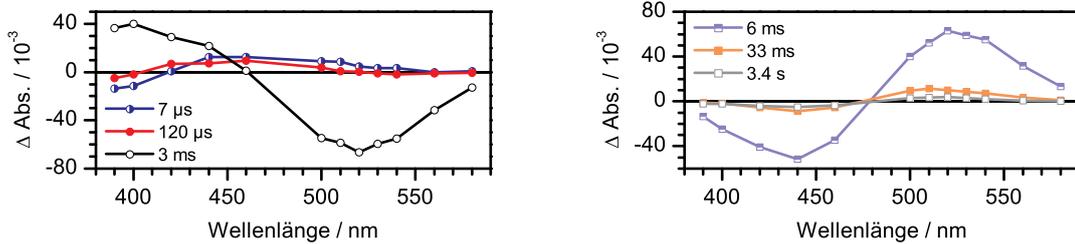
einem Ausläufer dieses Signals zuzuordnen. Die Signatur des ausgebleichten Grundzustands kann am besten bei 440 nm beobachtet werden. Der im Zeitbereich bis 1 ms beobachtete Abfall des Signals kann der Überlagerung des positiven Signals des rotverschobenen Intermediats zugeordnet werden. Das negative Signal zerfällt danach mit einer Hauptkomponente im einstelligen Millisekundenbereich. Weitere Komponenten der Rückbildung sind auf einer 50 ms und 3 s-Zeitskala zu erwarten. Die transienten Absorptionsänderungen bei 520 nm sind charakteristisch für die Dynamik der rotverschobenen Intermediate. Direkt nach Anregung ist ein Differenzspektrum zu beobachten, das dem transienten Spektrum nach 1,8 ns sehr ähnlich ist. Man kann daher davon ausgehen, dass die positive Absorptionsbande dem in Anreg-Abtast-Experimenten zugeordneten K-Intermediat zugeschrieben werden kann. Die beobachtete positive Absorptionsänderung von  $25 \times 10^{-3}$  nimmt während der ersten Mikrosekunden ab. Diesem Zerfall folgt ein weiterer Aufbau des Differenzsignals, was bedeutet, dass in diesem Spektralbereich zu späteren Zeiten ein weiteres Intermediat,  $P_{520}$ , absorbiert. Der Abbau dieser Spezies wird mit drei Komponenten auf einer Zeitskala von wenigen Millisekunden bis hin zu Sekunden beobachtet.

Um die beobachteten dynamischen Unterschiede zu festigen, wurde den Daten in einer globalen Fitanalyse eine Summe aus Exponentialfunktionen angepasst. Ein Fit mit 6 Zerfallszeiten lieferte hierbei ein optimales Ergebnis. Eine Zusammenfassung der Zeitkonstanten ist in Tabelle 8.5 gegeben. Die Amplitudenspektren sind in Abbildung 8.21 dargestellt. Gemäß dieser lässt sich der Photozyklus von ChR-2 wie folgt interpretieren:

Das zerfallenssoziierte Spektrum der kürzesten Zeitkonstante  $\tau_1 = 7 \mu\text{s}$  besitzt unterhalb von 420 nm eine negative Amplitude und oberhalb eine positive. Diese kann von

	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\tau_5$	$\tau_6$
ChR-2	$7 \mu\text{s}$	$120 \mu\text{s}$	3 ms	6 ms	33 ms	3,4 s

**Tabelle 8.5:** Erhaltene Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der Blitzlichtphotolysedaten von ChR-2.

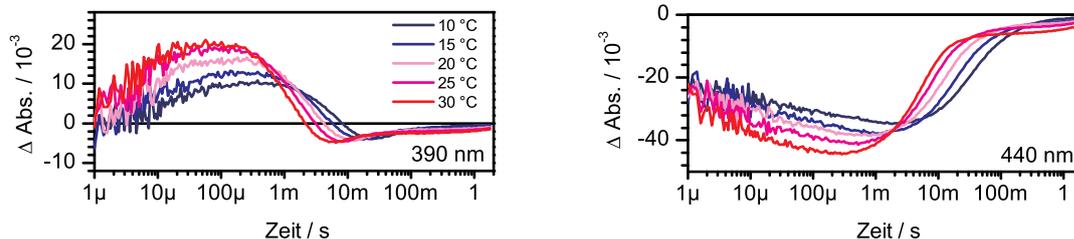


**Abbildung 8.21:** Zerfallassozierte Spektren der globalen Anpassung der Blitzlichtphotolysedaten von ChR-2. Links sind dabei die Amplituden der ersten drei Zeitkonstanten gezeigt, rechts die der langsameren drei.

500 nm bis 550 nm dem Zerfall des K-Intermediats zugeordnet werden. Im Bereich der Grundzustandsabsorptionsbande beschreibt die positive Amplitude die weitere Abnahme des bereits negativen Differenzsignals. Dies kann einerseits auf die Überlagerung des Grundzustand-Bands mit dem K-Intermediat zurückgeführt werden. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein weiteres, vielleicht  $\text{BR}_L$ -ähnliches Intermediat den Grundzustand überlagert und mit dieser Zeitkonstante zerfällt. Die negative Amplitude bei Wellenlängen  $< 420 \text{ nm}$  zeigt, dass das blau-verschobene  $\text{P}_{390}$ -Intermediat mit dieser Zeitkonstante gebildet wird. Die nachfolgende Zeitkonstante  $\tau_2 = 120 \mu\text{s}$  weist einen sehr ähnlichen spektralen Verlauf auf. Lediglich die Amplitude oberhalb 500 nm ist vernachlässigbar klein. Diese Zeitkonstante sollte demnach nicht mehr mit dem Zerfall des K-Intermediats in Verbindung stehen. Der Prozess trägt jedoch ebenfalls zur Bildung von  $\text{P}_{390}$  bei. Er ist daher verantwortlich für die Plateau-artige Charakteristik der Absorptionsänderung bei 390 nm. Das zerfallassozierte Spektrum von  $\tau_3 = 3 \text{ms}$  zeigt mit seiner dominanten positiven Amplitude im Bereich der Absorption von  $\text{P}_{390}$  und der negativen Amplitude im Bereich von  $\text{P}_{520}$  den Zerfall des blau-verschobenen Intermediats, durch den die nachfolgende rot-verschobene Spezies populiert wird. Die Amplitudenspektren der Zeitkonstanten  $\tau_4 = 6 \text{ms}$ ,  $\tau_5 = 33 \text{ms}$  und  $\tau_6 = 3,4 \text{s}$  sind spektral nahezu identisch. Alle drei besitzen negative Beiträge zwischen 390 nm und 480 nm und hiernach bis 580 nm positive Beiträge. Dies kann entsprechend einem triexponentiellen Zerfall des  $\text{P}_{520}$ -Intermediats zugeordnet werden, bei dem in jedem dieser Schritte der Grundzustand repopuliert wird.

### Temperaturabhängige Messungen

Temperaturabhängige Blitzlichtphotolyse-Messungen wurden zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  bei drei unterschiedlichen Abtastwellenlängen durchgeführt. Die ausgesuchten Wellenlängen sind kennzeichnend für die Absorption der blau- (390 nm) und rot-verschobenen Intermediate (520 nm) sowie für die Bleichbande des angeregten all-*trans*-Retinal-Ausgangszustands (440 nm). In den Abbildungen 8.22 und 8.23 sind die erhaltenen temperaturabhängigen transienten Absorptionsänderungen dargestellt. Die Transiente bei 390 nm zeigt,

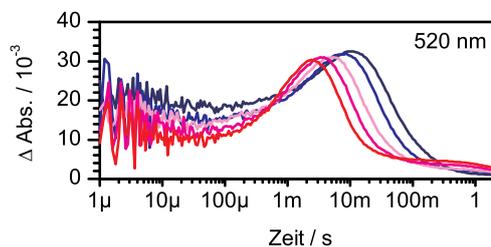


**Abbildung 8.22:** Temperaturabhängige transiente Absorptionsänderung von ChR-2 im Bereich der Absorption des Photointermediats  $P_{390}$  und des gebleichten Ausgangszustands bei 440 nm. Die Temperaturen, bei denen die Transienten aufgenommen wurden, sind farblich kodiert.

dass sowohl der Aufbau als auch der Zerfall des  $P_{390}$ -Intermediats mit höherer Temperatur bei früheren Zeiten stattfindet. Die in dieser Transiente bei langen Zeiten beobachteten Ausläufer des Grundzustandsbleichens zeigen ebenso eine veränderte Charakteristik. Dies ist noch um einiges besser in den transienten Absorptionsänderungen bei 440 nm zu erkennen. Über den gesamten beobachteten Zeitbereich ist eine Beschleunigung der Dynamik mit erhöhter Temperatur zu sehen. Die zeitliche Antwort der rot-verschobenen Intermediate nach Photoanregung ist in Abbildung 8.23 wiedergegeben. Der Abfall der anfänglichen Absorption ebenso wie die Bildung und der Zerfall der späteren Signatur weisen eine ausgeprägte Beschleunigung bei Temperaturerhöhung auf.

Zur weiteren Evaluation der Daten wurde diesen in einer globalen Fitanalyse eine Summe an Exponentialzerfällen angepasst. Eine Zusammenfassung der erhaltenen Zerfallskonstanten ist in Tabelle 8.6 gegeben. Die beobachtete Temperaturabhängigkeit konnte für  $\tau_1$  bis  $\tau_5$  validiert werden. Die erhaltenen Zeitkonstanten weisen bei erhöhter Messtemperatur geringere Werte auf. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Werte der letzten Zeitkonstante  $\tau_6$  nicht dem für  $\tau_1$  bis  $\tau_5$  bestimmten Trend folgen. Der abgeschätzte Fehler der Zeitkonstanten liegt bei  $\pm 2$  s, was bedeutet, dass ein möglicher Temperatureffekt aus diesen Messungen nicht bestimmt werden kann. Die Zeitkonstanten sind aus diesem Grund nicht in Tabelle 8.6 enthalten.

In der Folge wurde daher eine weitere temperaturabhängige Messreihe mit einer ver-



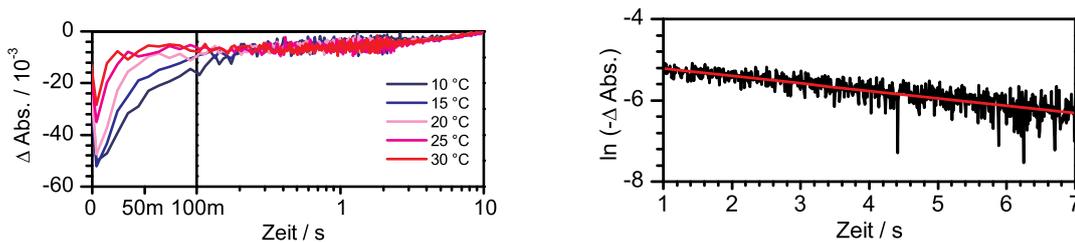
**Abbildung 8.23:** Temperaturabhängige transiente Absorptionsänderung von ChR-2 im Bereich der Absorption der rot-verschobenen Photointermediate bei 520 nm. Die Temperaturen sind analog zu Abbildung 8.22 farblich kodiert.

	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\tau_5$	$\tau_6$
T = 10°C	18 $\mu$ s	400 $\mu$ s	10 ms	12 ms	86 ms	4,2 s
T = 15°C	10 $\mu$ s	170 $\mu$ s	6 ms	9 ms	49 ms	5,8 s
T = 20°C	9 $\mu$ s	140 $\mu$ s	3,5 ms	8,5 ms	43 ms	4,7 s
T = 25°C	7 $\mu$ s	140 $\mu$ s	2 ms	6 ms	28 ms	6,2 s
T = 30°C	4 $\mu$ s	70 $\mu$ s	1,5 ms	4,5 ms	22 ms	4,9 s
$\Delta H^\ddagger$ / kJ mol <sup>-1</sup>	46 $\pm$ 7	50 $\pm$ 10	67 $\pm$ 4	31 $\pm$ 4	45 $\pm$ 5	0 $\pm$ 20
$\Delta S^\ddagger$ / J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	8 $\pm$ 30	0 $\pm$ 40	30 $\pm$ 20	-100 $\pm$ 20	-70 $\pm$ 20	-276 $\pm$ 1

**Tabelle 8.6:** Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der temperaturabhängigen Blitzlichtphotolyse-daten. Die ersten fünf Zeitkonstanten entstammen den in den Abbildungen 8.22 und 8.23 dargestellten Messungen.  $\tau_6$  wurde der Anpassung der Blitzlichtphotolyse-daten im Zeitbereich von 1 ms bis 10 s entnommen. In dieser Anpassung wurde der in den vorangegangenen Messreihen ermittelte Wert von  $\tau_5$  als Startwert für die Anpassung benutzt. In den letzten zwei Spalten sind die aus den temperaturabhängigen Zeitkonstanten über die Eyring-Gleichung berechneten thermodynamische Parameter inklusive der über Gaußsche Fehlerfortpflanzung abgeschätzten Fehler gegeben. Die Werte für  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  der letzten Zeitkonstante  $\tau_6$  sind dabei aus der Auftragung des gemittelten Werts für alle Temperaturen berechnet worden. Der Fehler von  $\Delta S^\ddagger$  ist daher sehr gering.

längerten Zeitachse bis 10 s durchgeführt. Hierbei wurde nur bei einer Abtastwellenlänge von 440 nm gearbeitet, da der Prozess, der mit der letzten Zeitkonstante  $\tau_6$  verknüpft ist, die Rückkehr der ursprünglich angeregten Population beschreibt.

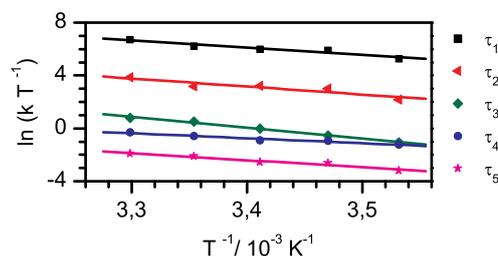
Die erhaltenen transienten Absorptionsänderungen bei den gewählten Temperaturen sind in Abbildung 8.24 dargestellt. Die anfängliche Dynamik im Bereich bis zu 1 s spiegelt die Temperaturabhängigkeit der Zeitkonstanten  $\tau_5$  wider. Der nachfolgende Zeitverlauf ist aber im Rahmen des Fehlers nicht durch Temperaturänderungen von 10 °C bis 30 °C beeinflusst. Zur weiteren Rauschreduktion wurden die erhaltenen Kurven gemittelt und in Form des natürlichen Logarithmus der negativen Absorptionsänderung gegen die Zeit aufgetragen.



**Abbildung 8.24:** Links: Temperaturabhängige transiente Absorptionsänderung von ChR-2 im Bereich des Bleichsignals der angeregten all-*trans*-Spezies. Der Zeitbereich bis 100 ms ist linear geplottet, der nachfolgende Bereich ist bis 10 s logarithmisch dargestellt. Rechts: Logarithmische Auftragung der über alle Temperaturen gemittelten transienten Absorptionsänderungen von ChR-2 gegen die Zeit. Ein linearer Verlauf der Daten ist deutlich erkennbar.

Der erhaltene lineare Kurvenverlauf dieser Auftragung (Siehe Abbildung 8.24, rechts) zeigt deutlich, dass die beobachtete Kinetik erster Ordnung ist. Die lineare Regression des Zeitverlaufs ergab eine Zeitkonstante von  $5,4 \pm 0,2$  s.

Um die Aktivierungsbarrieren zwischen den Intermediaten und ihrer jeweiligen Übergangszustände zu bestimmen, wurden die Daten über die Eyring-Gleichung (4.14) ausgewertet. Die hierfür gewählte Auftragung ist in Abbildung 8.25 dargestellt. Aus dem sich hieraus ergebenden linearen Verlauf konnte über die Steigung und den Achsenabschnitt die Enthalpie- und Entropieänderungen zwischen dem jeweiligen Photointermediat und seinem Übergangszustand berechnet werden. Die berechneten thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 8.6 gegeben.

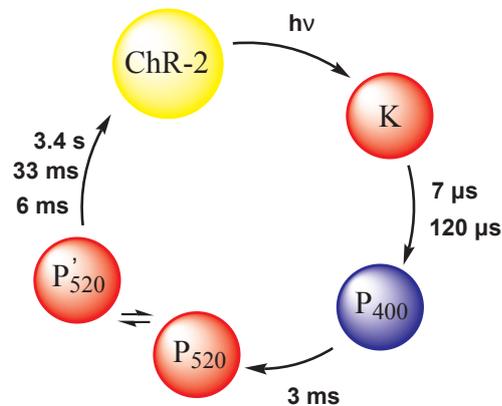


**Abbildung 8.25:** Eyring-Plot der temperaturabhängigen Blitzlichtphotolysedaten. Der lineare Verlauf kann über lineare Regression der Datenpunkte ausgewertet werden. Über die jeweilige Steigung erhält man den zugehörigen Wert für  $\Delta H^\ddagger$  und über den Achsenabschnitt  $\Delta S^\ddagger$ .

## Interpretation der Photozyklusdynamik und seiner Reaktionsbarrieren

Die sich der Primärreaktion anschließende Dynamik wurde im sichtbaren Spektralbereich mit Hilfe der Blitzlichtphotolysetechnik untersucht. Im Einklang mit vorherigen Publikationen ist die Absorption des rot-verschobenen K-Intermediats auf einer sub- $\mu\text{s}$ -Zeitskala beobachtbar [302, 309, 314, 333]. Der Zerfall dieser Signatur geht mit der Bildung eines Photoprodukts  $P_{390}$  einher, das bei Wellenlängen  $< 420$  nm absorbiert ( $\tau_1 = 10 \mu\text{s}$ ). Neben  $\tau_1$  trägt auch die nachfolgende Zeitkonstante  $\tau_2$  zur Bildung der  $P_{390}$ -Spezies bei. Allerdings zeigt das zerfallenssoziierte Spektrum dieser Komponente keine signifikanten Beiträge zum K-Zerfall. Bis jetzt ist wenig über die funktionelle Relevanz des blau-verschobenen Intermediats des ChR-2-Photozyklus bekannt. FTIR-Daten sind für dieses Intermediat bis jetzt nicht publiziert. Das Absorptionsmaximum von etwa 390 nm weist aber darauf hin, dass die Schiffbase deprotoniert vorliegt, wie dies im  $BR_M$ -Intermediat der Fall ist. Die bis zum jetzigen Zeitpunkt veröffentlichten Daten zeigen, dass dieses Intermediat nicht mit der Aktivität des Kanals verknüpft ist. In Übereinstimmung mit Ritter et al. [314] zerfällt die M-ähnliche  $P_{390}$ -Population mit  $\tau_3 = 3$  ms, wobei gleichzeitig eine rot-verschobene Absorptionsbande bei 520 nm gebildet wird. Elektrophysiologische Studien ordnen diesen Schritt der Öffnung des Kanals zu [309]. Der Zerfall von  $P_{520}$  wird mit drei Exponentialfunktionen beschrieben ( $\tau_4 = 6$  ms,  $\tau_5 = 33$  ms,  $\tau_5 = 3,4$  s). Die

Amplitudenspektren dieser Komponenten zeigen, dass hierbei auch der ausgebleichte Grundzustand repopuliert wird. Die Zeitkonstanten von 6 ms und 33 ms stimmen gut mit publizierten Werten für das Kanalschließen überein [309, 311]. Dies bedeutet, dass die Komponenten  $\tau_4$  und  $\tau_5$  wahrscheinlich mit diesem Prozess verknüpft werden können. Dennoch sind drei individuelle Grundzustandsrepopulationsschritte sehr ungewöhnlich für Retinalproteine. Eine Erklärung hierfür wäre ein ausgeprägtes nicht-exponentielles Verhalten, das nicht vom benutzten Modell erfasst werden kann. Um dem nachzugehen wurde versucht die Millisekunden-Dynamik auch mit gestreckten Exponentialfunktionen, die häufig für die Beschreibung der Relaxation hochgradig gestörter Systeme benutzt werden, anzupassen. Das Resultat war aber nicht zufriedenstellend. In Analogie zu den letzten Schritten des Photozyklus von BR oder PR kann das multiexponentielle Verhalten auch als Verschiebung zwischen den Gleichgewichten mehrerer spektral-stiller oder leicht verschobener Intermediate gewertet werden [30, 133]. Berücksichtigt man die Resultate von Radu et al. [313] so ergeben sich mindestens zwei späte Intermediate im Photozyklus von ChR-2, die in dieser Publikation  $P_3$  und  $P_4$  genannt werden. Es wird diskutiert, dass  $P_3$  ein leitender Zustand ist, während  $P_4$  die typischen Merkmale eines quasi relaxierten Retinalchromophors zeigt, aber dennoch eine starke Differenzbande im Bereich der Amid I-Bande aufweist. Schlussendlich kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Besetzung der Kanäle mit unterschiedlich vielen Ionen Grund der beobachteten multiexponentiellen Relaxationspfade ist. Eine schematische Übersicht über den beschriebenen Photozyklus ist in Abbildung 8.26 gegeben.



**Abbildung 8.26:** Schematische Darstellung des Photozyklus von ChR-2. Die mittels der globalen Anpassung erhaltenen Zeitkonstanten sind dabei auf das dargestellte zyklische Modell übertragen worden.

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, wurde die Temperaturabhängigkeit des ChR-2-Photozyklus zwischen 10°C und 30°C bei drei verschiedenen Wellenlängen bestimmt. Die globale Fitanalyse zeigte, dass wie im Fall der Raumtemperaturdaten sechs Zeitkonstanten ein adäquates Fitergebnis liefern. Hierbei weisen die ersten fünf Komponenten ( $\tau_1$  bis  $\tau_5$ ) eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit auf. Eine Temperatur-

erhöhung resultiert dabei in einer Beschleunigung der Reaktion, die in der Verringerung der Zeitkonstante deutlich wird. Für die letzte Zeitkonstante  $\tau_6$  konnte hingegen keine Temperaturabhängigkeit festgestellt werden. Eine zusätzliche Messung mit verlängertem Abfragezeitraum konnte dies bestätigen. Die temperaturabhängigen Reaktionsraten wurden anschließend mit der Eyring-Gleichung ausgewertet. Die Auftragung von  $\ln \frac{k}{T}$  gegen  $\frac{1}{T}$  ergab einen linearen Zusammenhang (Siehe Abbildung 8.25), der die Berechnung der Enthalpie- und Entropiedifferenzen zwischen dem Übergangszustand und dem jeweiligen Edukt erlaubt. Ein Überblick über die berechneten Parameter ist in Tabelle 8.6 gegeben.

Ein erster Blick auf die erhaltenen thermodynamischen Werte zeigt, dass der Photozyklus entropisch getrieben ist, da sich die Enthalpieänderungen der einzelnen Reaktionsschritte nicht drastisch ändern. Die erhaltenen Werte von  $\Delta H^\ddagger \approx 50 \text{ kJ mol}^{-1}$  liegen in einem typischen Bereich für Protein-Reaktionsschritte, in denen Konformationsänderungen vollzogen werden. Im Detail: Für die ersten zwei Reaktionsschritte ( $\tau_1$  und  $\tau_2$ ), die dem Zerfall des ersten K-artigen Photoprodukts sowie dem Aufbau der hierauf folgenden M-artigen Spezies zugeschrieben werden, wurden Enthalpieänderungen von  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnet. Diese Werte liegen in einem Bereich, der auch für andere Retinalproteine gefunden wurde [275, 334, 335]. Es wurden keine signifikanten Entropieänderungen für diese Übergänge berechnet. Der folgende Abbau des M-artigen Intermediats und der damit verbundene Aufbau der späten rot-verschobenen Intermediate ( $\tau_3$ ) zeigt mit  $67 \text{ kJ mol}^{-1}$  die höchste Enthalpieänderung des gesamten Reaktionszyklus. Die gleichzeitige positive Entropieänderung lässt vermuten, dass der Übergangszustand wahrscheinlich wesentlich ungeordneter als  $P_{390}$  ist. Da der Übergang hiermit exergonisch sein sollte, besagt das Hammond Postulat, dass der Produktzustand auch ungeordneter als der Eduktzustand sein sollte. Dies passt sehr gut mit der Zuordnung dieses Prozesses zur Öffnung des Kanals zusammen. Die ersten zwei temperaturabhängigen Schritte der Grundzustandsrepopulierung  $\tau_4$  und  $\tau_5$  weisen Enthalpieänderungen von  $30 \text{ kJ mol}^{-1}$  bzw.  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  auf. Zum Vergleich, bei Einzelkanalmessungen wurde unter Annahme eines einfachen Kanal-offen / Kanal-geschlossenen-Modells eine Enthalpieänderung von  $64 \pm 11 \text{ kJ mol}^{-1}$  für die Schließung des Kanals berechnet [311]. Interessanterweise sind die Entropieänderungen der letzten zwei Reaktionsschritte stark negativ. Dies zeigt, dass das Ende des Reaktionszyklus und hiermit das Schließen des Kanals sowie die Reisoomerisierung des Chromophors stark Entropie-gebremst ist. Der Übergangszustand weist vermutlich eine starrere Struktur als  $P_{520}$  auf. Dies deckt sich mit der Vorstellung, dass in diesen Schritten die geschlossene Konformation des Kanals wiederhergestellt wird.

Der letzte Prozess ( $\tau_6$ ) im Sekunden-Zeitbereich weist im Rahmen des Fehlers keine Temperaturabhängigkeit auf. Bis jetzt ist nicht eindeutig klar, warum dies der Fall ist. Es kann daher nur über den Ursprung dieses Verhaltens spekuliert werden. Künstlich generierte Diffusionsprozesse durch Konvektion im Laserspot werden ausgeschlossen, da diese auch eine geringe Temperaturabhängigkeit aufweisen sollten. Eine mögliche Erklärung der Temperaturunabhängigkeit bietet jedoch die Annahme, dass das Schließen des Kanals und die Reisoomerisierung des Chromophors mit einer Reihe sequenzieller Prozesse einhergeht, bei denen sich die Population auf einer relativ rauen Potential-

hyperfläche bewegt. Die Annahme, dass die diversen kleinen Energiebarrieren kleiner als  $k_B T$  sind, würde bedeuten, dass die Aktivierungsenthalpie für das Voranschreiten der Reaktion irrelevant wäre. Als Resultat sollte die beobachtete Rate temperaturunabhängig sein. Der Übergangszustand würde daher von dem entropischen Term bestimmt, der stark negativ sein sollte. Im vorliegenden Fall wurde ein Wert von  $\Delta S = -276 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  berechnet. Auf molekularer Ebene könnte dies als umfangreicher Reorganisationsprozess des Proteins interpretiert werden, bei dem die anfängliche geschlossene Konfiguration wieder hergestellt wird. Gestützt wird diese Hypothese davon, dass die von Radu et al. [313] auf strukturelle Änderungen der Retinalbindetasche zurückgeführte Bande bei  $1660 \text{ cm}^{-1}$  auch auf der 5 s-Zeitskala zerfällt.

## 8.5 Der Einfluss von Imidazol auf die Langzeitkinetik

Im folgenden Teil der Arbeit wird der Einfluss des externen Donors Imidazol auf die Langzeitdynamik mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse-Technik untersucht. Imidazol ist ähnlich wie Azid dafür bekannt sowohl die Schiffbasen Deprotonierungs- als auch die Reprotonierungsschritte zu beeinflussen.



**Abbildung 8.27:** Strukturformeln der protonierten Form von Imidazol (links) und Azid (rechts).

Der Einfluss von Azid wurde bis heute vielfältig untersucht und ein generelles Verständnis für die Wirkungsweise wurde damit ermöglicht [215, 218, 336–341]. Ein Einfluss von Imidazol ist hingegen nur in zwei Einzelfällen sensorischer Rhodopsine (Mutanten NpSR II F86D sowie SRI H116A) festgestellt worden, was auf eine höhere Spezifität hinweist [342, 343].

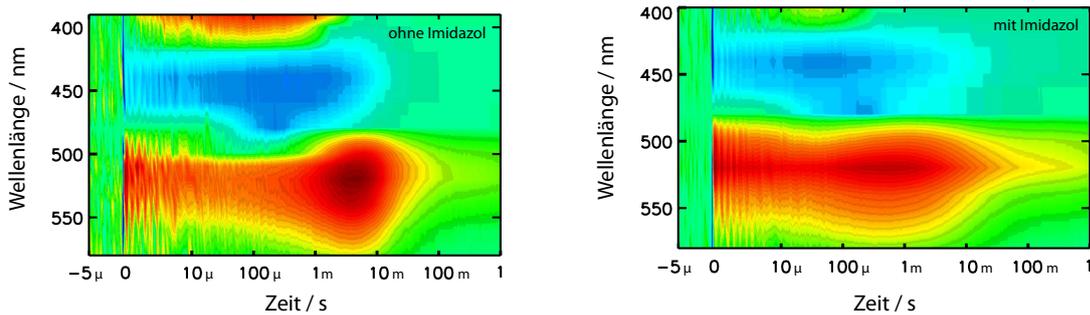
### Experimentelle Vorgehensweise

Um eine Vergleichbarkeit zu den vorherigen Blitzlichtphotolysemessungen zu gewährleisten, wurden die Untersuchungen an der von der Arbeitsgruppe von Prof. E. Bamberg, MPI Frankfurt, bereitgestellten Imidazol-haltigen ChR-2-Probe [331] (OD 0,7 bei 1 cm Schichtdicke, 20 mM HEPES, pH 7,4, 0,2% DM, 500 mM Imidazol, 100 mM NaCl) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 480 nm bei einer Pulsenergie von  $\approx 4 \text{ mJ cm}^{-2}$ . Es wurde im Spektralbereich von 400 nm bis 580 nm in 20 nm Schritten abgetastet, wobei die Intensität des Lichts so gering war, dass aktinische Effekte auszuschließen sind. Für die einzelnen Transienten wurden Datenpunkte zwischen -40 ms und 1.96 s mit einer Schrittweite von 200 ns aufgenommen, 1000 Scans wurden gemittelt. Für den Bereich bis  $+5 \mu\text{s}$  wurden die Daten direkt benutzt,

die nachfolgenden Zeitachse zwischen  $5\ \mu\text{s}$  und  $1,96\ \text{s}$  wurde in eine 200 Datenpunkte umfassende exponentielle Basis umgewandelt.

## Ergebnisse

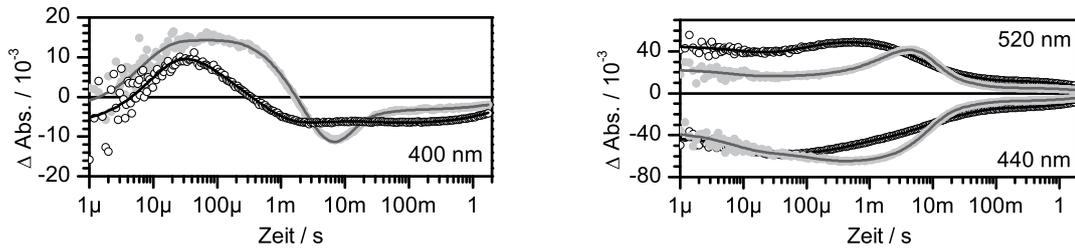
Abbildung 8.28 stellt die transienten Absorptionsänderungen von ChR-2 mit und ohne Imidazol gegenüber. Beide 2D-Repräsentationen weisen neben der in blau eingefärbten negativen Absorptionsänderung der ausgebleichten all-*trans*-Retinal-Population rot gekennzeichnete photoinduzierte Absorptionzunahmen bei Wellenlängen  $\leq 420\ \text{nm}$  und um  $520\ \text{nm}$  auf. Diese können analog der Zuordnung in Abschnitt 8.4 der Absorption des M-ähnlichen  $P_{390}$ -Intermediats, des K-Intermediats sowie der am Ende des Photozyklus auftretenden  $P_{520}$ -Spezies zugeschrieben werden. Obgleich die Banden in beiden Probenformen spektral an der gleichen Position zu finden sind, zeigen schon die Übersichtsplots, dass die zeitlichen Verläufe wesentliche Unterschiede aufweisen. Das blau-verschobene  $P_{390}$ -Intermediat zerfällt auf einer schnelleren Zeitskala als bei der Imidazol-freien Probe. Auch die maximale Amplitude der  $P_{520}$ -Charakteristik ist nach Zugabe von Imidazol bei früheren Zeiten zu beobachten. Nach  $1,9\ \text{s}$  ist für beide Probenformen noch ein Restdifferenzsignal beobachtbar.



**Abbildung 8.28:** Vergleich der transienten Absorptionsänderungen von ChR-2 ohne (links) und mit (rechts) Imidazol nach Anregung bei  $480\ \text{nm}$  in einem Zeitbereich von  $-5\ \mu\text{s}$  bis  $1\ \text{s}$ . Die Zeitachse ist dabei bis  $10\ \mu\text{s}$  linear skaliert, hiernach logarithmisch. Die Hauptbeiträge stammen von der Depopulierung des angeregten all-*trans*-Retinal-Zustands sowie den im Photozyklus auftretenden blau- und rot-verschobenen Intermediaten.

Um den Imidazoleffekt auf die Dynamik direkt zu beobachten, ist in Abbildung 8.29 für jede der drei beobachteten Banden repräsentativ eine Transiente gezeigt. Die Signale sind dabei auf die Anregungsenergie und die Absorption der Probe skaliert.

Ein Vergleich der transienten Absorptionsänderung von ChR-2 mit und ohne Imidazol zeigt bei  $400\ \text{nm}$  anfänglich den gleichen Verlauf. Die positive Signatur des blau verschobenen Photointermediats  $P_{390}$  wird mit ungefähr  $10\ \mu\text{s}$  aufgebaut. Die Absorptionsbande der imidazolfreien Probe erreicht hiernach ein Plateau und zerfällt wie in Abschnitt 8.4 gezeigt wurde mit einer Zeitkonstante von  $3\ \text{ms}$ . Der zeitliche Verlauf der imidazolhaltigen Probe weisen hingegen eine völlig andere Signatur auf. Nach Erreichen

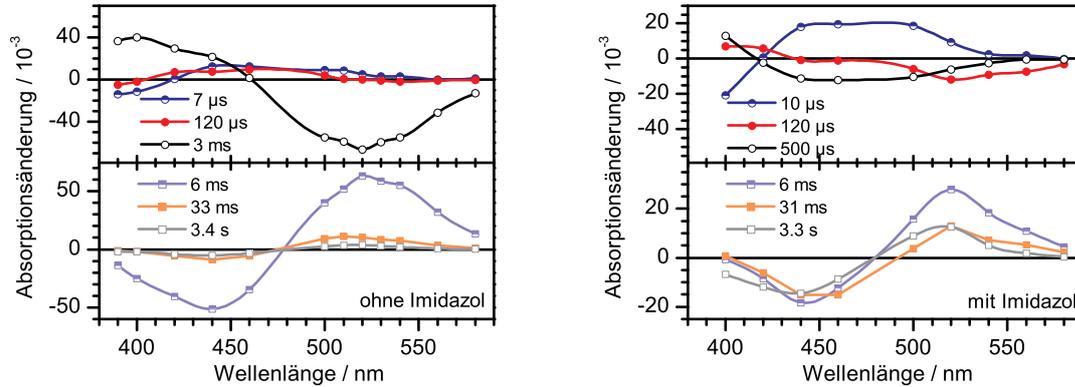


**Abbildung 8.29:** Vergleich der transienten Absorptionsänderungen von ChR-2 ohne (●) und mit Imidazol (○) nach Anregung bei 480 nm. Exemplarische Transienten für den Bereich der Absorption des  $P_{390}$ -Photoprodukts (400 nm), dem Signal des depopulierten all-*trans*-Retinal-Ausgangszustands (440 nm) sowie der rotverschobenen Spezies K und  $P_{520}$  (520 nm) sind dargestellt.

der maximalen positiven Absorption bei  $30 \mu\text{s}$  zerfällt das Signal sofort wieder auf einer hundert  $\mu\text{s}$ -Zeitskala. Zu späten Zeiten werden bei beiden Probenformen negative Differenzsignale beobachtet. Diese können auf Ausläufer des ausgebleichten Ausgangszustands zurückgeführt werden. Die transienten Absorptionsänderungen der ausgebleichten all-*trans*-Retinal-Spezies sind in Abbildung 8.29 rechts dargestellt. Beide Proben weisen ein nahezu identisches zeitliches Verhalten bis ca.  $20 \mu\text{s}$  auf. Eine weitere Abnahme des bereits negativen Signals ist für beide Präparationen erkennbar. Dieses lässt sich auf Überlagerungen mit dem frühen K-Intermediat erklären. Hiernach ändert sich der Verlauf der Proben. Die transienten Absorptionsänderungen der imidazolfreien ChR-2-Probe weist eine weitere Abnahme auf, während der Verlauf der imidazolhaltigen Probe einen Wendepunkt erreicht und der Ausgangszustand auf mehreren Zeitskalen repopuliert wird. Der eben beschriebene Wendepunkt wird in der zeitlichen Absorptionsänderung der Präparation ohne Imidazol erst bei etwa  $1 \text{ms}$  erreicht. Die Dynamik zu langen Zeiten verläuft wieder sehr ähnlich.

Die transienten Absorptionsänderungen bei 520 nm zeigen zeitlich ein ähnliches Verhalten wie bei der Grundzustandsbleichbande. Die anfängliche Dynamik, die den Zerfall des mit Photoanregung gebildeten K-Intermediats beschreibt, als auch die zeitliche Charakteristik des Zerfalls der späten  $P_{520}$ -Spezies weisen für beide Proben eine hohe Ähnlichkeit auf. Zwischen  $20 \mu\text{s}$  und  $40 \text{ms}$  sind aber beachtliche Unterschiede im Verlauf erkennbar. Die Zugabe von Imidazol beschleunigt die Bildung des späten Intermediats fast um einen Faktor 10.

Um die beobachteten dynamischen Unterschiede zu festigen, wurden die Daten anschließend in einer globalen Fitanalyse angepasst. Ein Fit mit sechs Zerfallszeiten lieferte auch für die Daten der imidazolhaltigen Probe ein optimales Resultat. Eine Zusammenfassung der Zeitkonstanten ist in Tabelle 8.7 gegeben. Die Gegenüberstellung der Zeitkonstanten spiegelt den schon in den transienten Absorptionsänderungen der Einzelwellenlängen beobachteten Trend wider. Sowohl die ersten zwei Zeitkonstanten wie auch die letzten drei sind im Rahmen des Fehlers identisch. Die Ähnlichkeit der Amplitudenspektren von  $\tau_1$ ,  $\tau_4$ ,  $\tau_5$  und  $\tau_6$  beider Probenformen (Abbildung 8.30) zeigt, dass die diesen Komponenten unterliegenden Prozesse identisch sind. Das zerfallensassoziierte Spektrum von  $\tau_2$  zeigt aber



**Abbildung 8.30:** Zerfallasoziierte Spektren der globalen Anpassung der Blitzlichtphotolysedaten von ChR-2 ohne (links) und mit (rechts) Imidazol.

trotz der Übereinstimmung der Zeitkonstante signifikante Abweichungen.

Im Detail: Der Abbau des frühen rot verschobenen Intermediats und der damit einhergehende Aufbau des blau-verschobenen Intermediats  $P_{390}$  wird in beiden Probenpräparationen mit der kürzesten Zeitkonstante  $\tau_1$  beschrieben. Der Betrag der Zeitkonstante als auch die spektrale Signatur des zugehörigen Amplitudenspektrums weisen eine hohe Übereinstimmung auf. Obgleich sich die Werte der nachfolgenden Zeitkonstante  $\tau_2$  für ChR-2 mit und ohne Imidazol decken, weisen die zerfallasoziierten Spektren große Abweichungen auf. Während  $\tau_2$  in der imidazolfreien Probe mit der Bildung des blau-verschobenen Intermediats assoziiert ist (negative Amplitude), trägt es nach Zugabe von Imidazol zu dessen Abbau bei (positive Amplitude). Zusätzlich zeigt die negative Amplitude um 520 nm, dass der beobachtete Prozess für ChR-2 mit Imidazol noch mit der Bildung später rot-verschobener Intermediate verknüpft ist. Dieser Beitrag ist in der reinen Probe nicht zu beobachten. Die markantesten Unterschiede treten aber in  $\tau_3$  auf. Der Wert dieser Zeitkonstante verringert sich von 3 ms auf 500  $\mu\text{s}$  für ChR-2 mit Imidazol. Die Amplitudenspektren zeigen jeweils den Abbau von  $P_{390}$ , weichen aber für Wellenlängen  $\geq 420$  nm voneinander ab. Während für ChR-2 ohne Imidazol dominant der Beitrag zum Aufbau der rot verschobenen Spezies zu erkennen ist, ist dieser für die Präparation, die Imidazol enthält, auf die blaue Flanke dieser Spezies beschränkt. Die Zuordnung der nachfolgenden Zerfallskanäle ist wieder für beide Präparationen gleich. Die

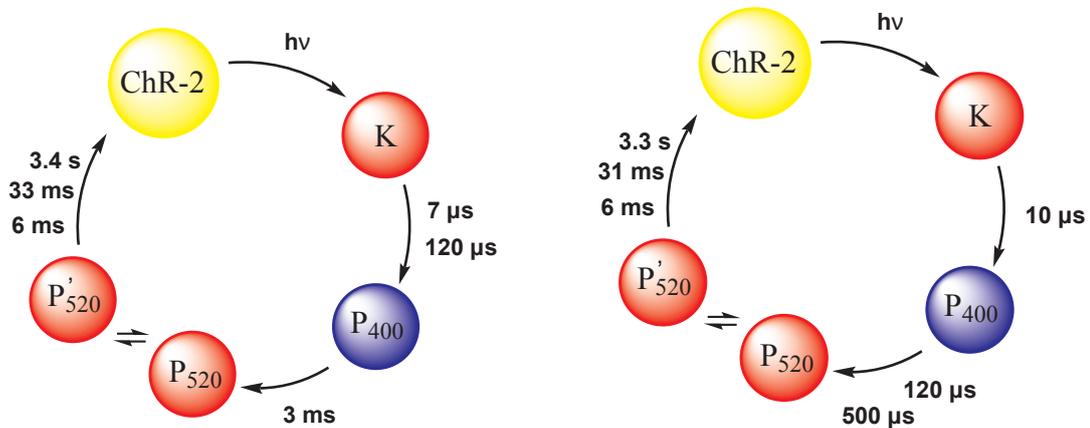
	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$	$\tau_4$	$\tau_5$	$\tau_6$
ChR-2 ohne Imidazol	7 $\mu\text{s}$	120 $\mu\text{s}$	3 ms	6 ms	33 ms	3,4 s
ChR-2 mit Imidazol	10 $\mu\text{s}$	120 $\mu\text{s}$	500 $\mu\text{s}$	6 ms	31 ms	3,3 s

**Tabelle 8.7:** Erhaltene Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der Blitzlichtphotolysedaten von ChR-2 mit und ohne Imidazol.

Zeitkonstanten sind im Rahmen der Fehler identisch und auch die Amplitudenspektren zeigen eine sehr ähnliche spektrale Signatur. Einzig die Amplitude des zerfallenssoziierten Spektrums der Zeitkonstante  $\tau_4$  ist für ChR-2 ohne Imidazol wesentlich ausgeprägter.

### Diskussion des Imidazoleffekts auf den Photozyklus von ChR-2

Um den Einfluss von Imidazol auf die Langzeitdynamik des eukaryotischen Retinalproteins ChR-2 zu untersuchen, wurden Blitzlichtphotolysemessungen mit einer Zeitauflösung von 200 ns durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die spektralen Positionen der beobachteten Spezies nicht durch die Zugabe des Imidazols beeinflusst werden, sich die Dynamik zwischen  $10 \mu\text{s}$  und  $10 \text{ms}$  aber drastisch ändert. In dieser Zeitdomäne sind vor allem die Prozesse rund um den Auf- und Abbau des M-artigen  $\text{P}_{390}$ -Intermediats zu finden. Sowohl die transienten Absorptionsänderungen als auch die globale Fitanalyse zeigen, dass sich die Zugabe von Imidazol nicht nur auf die Zeitskala der stattfindenden Prozesse, sondern auch auf die Reaktionspfade auswirkt. Der der Zeitkonstante  $\tau_2$  zugeordnete Prozess trägt im Fall der imidazolfreien ChR-2-Probe zur Bildung der  $\text{P}_{390}$ -Spezies bei, während dieser nach Zugabe des externen Donors den Abbau beschreibt. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die rot-verschobenen Photointermediate nach Zugabe von Imidazol deutlich früher aufgebaut werden. Die größten Unterschiede sind jedoch in der Komponente  $\tau_3$  erkennbar. Hier sind sowohl der Betrag der Zeitkonstante als auch das zerfallenssoziierte Spektrum drastisch unterschiedlich. Für ChR-2 ohne Imidazol ist der zugeordnete Reaktionsschritt die Bildung von  $\text{P}_{520}$ . Im Amplitudenspektrum der analogen Zeitkonstante für ChR-2 mit Imidazol spielt dieser Prozess aber eine untergeordnete Rolle.



**Abbildung 8.31:** Schematische Darstellung der Photozyklen von ChR-2 ohne (links) und mit (rechts) Imidazol. Die mittels der globalen Anpassung erhaltenen Zeitkonstanten sind dabei auf das dargestellte zyklische Modell übertragen worden.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Gleichgewichte rund um die Schiffbasen De- und Reprotonierungsreaktionen durch die Zugabe von Imidazol stark beeinflusst

werden. Die Zugabe von Imidazol hat sowohl eine Beschleunigung der beobachteten Prozesse als auch modifizierte Reaktionswege zur Folge. Als unmittelbare Konsequenz wird auch die mit der Bildung der P<sub>520</sub>-Intermediate verknüpfte Öffnung des Kanals um fast einen Faktor 10 beschleunigt werden. Die Beschleunigung der Schiffbasen De- und Reprotonierungsreaktionen sind wohlbekannte Auswirkungen der Zugabe von Azid [300, 337, 340, 344]. Die veränderte Reaktionsdynamik wurde mit zwei unterschiedlichen Theorien erläutert. Die erste führt die Wirkung von Azid auf die Annahme zurück, dass sich Azid zwischen der Schiffbase und dem Bulkwasser hin und herbewegt [216, 345]. Die zweite Erklärung schreibt die Funktionalität der Änderung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks der Retinalbindetasche zu [336]. Äquivalente Imidazoleffekte sind bisher nur für zwei Mutanten sensorischer Rhodopsine publiziert worden. Die Zugabe von 10 mM Imidazol beschleunigte den Zerfall des M-ähnlichen S<sub>373</sub>-Zustands der H166A Mutante von SRI 10-fach. Allerdings wurde dieser Effekt auf die Wiederherstellung der Funktion des wichtigen Histidin-Rests zurückgeführt [343]. Im Falle der F86D Mutante aus NpSR<sub>II</sub> wurde gezeigt, dass die Zugabe externer Protonendonoren wie Azid und auch Imidazol die Reprotonierung der Schiffbase beschleunigt [342]. Eine Begründung für den beobachteten Effekt konnte nicht gefunden werden. Dennoch wurde eine direkte Teilnahme Imidazols im Protonentransportprozess als Donor oder aber auch die spezifische Wechselwirkung mit Asp-86 vorhergesagt, da die Wiederherstellung einer strukturellen Situation wie im Falle der H166A ausgeschlossen werden konnte.

Da die Proteinstruktur von ChR-2 bis jetzt noch nicht gelöst ist, ist es schwer den beobachteten Effekt auf struktureller Ebene zu klären. Es kann daher lediglich spekuliert werden. Zum einen erscheint ein direkter Einfluss des Imidazols als Teil eines Protonen-Donor-Komplexes wahrscheinlich, da die mutmaßlich für die Schiffbasen-Reprotonierung verantwortliche Aminosäure His-134 eine Imidazoleitenkette besitzt, deren Funktion durch das extern zugegebene Imidazol verstärkt, bzw. nachgeahmt werden könnte. Auch eine unspezifische Bindung kann nicht ausgeschlossen werden. Allerdings spricht die abgeschätzte Bindungskonstante im 100 mM Bereich (persönliche Mitteilung Christian Bamann) gegen eine spezifische Bindestelle.

## 8.6 Resümee

Durch zeitaufgelöste Spektroskopie im infraroten und sichtbaren Spektralbereich konnten eine Vielzahl neuer Erkenntnisse über den Photozyklus von ChR-2 gewonnen werden. Mit Hilfe von transientser Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich sowie der Fluoreszenzaufwärtskonvertierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass der durch Anregung mit blauem Licht erzeugte angeregte Zustand nach einem Relaxationsprozess im Bereich von 100 fs monoexponentiell mit 0,4 ps zerfällt. Im sichtbaren Spektralbereich ist hiernach für die schwingungsangeregten Populationen des all-*trans*-Retinal-Ausgangszustands sowie des 13-*cis*-Retinal-Photoprodukts ein Kühlprozess ( $\tau_3 = 2,7$  ps) beobachtbar. Die große Übereinstimmung der Zeitkonstanten sowie der zugeordneten Prozesse mit den Kurzzeitdynamiken von BR und NpSR<sub>II</sub> zeugt davon

[157, 164, 165, 168, 172, 174, 346–349], dass die elektrostatischen Gegebenheiten sowie das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in der Retinalbindetasche von ChR-2 sehr ähnlich sind. Die Primärdynamik sollte demnach mit den für BR aufgestellten Modellen beschrieben werden können (Siehe Kapitel 6). Durch die schnelle Deaktivierung des angeregten Zustands war es zudem möglich in transienten Absorptionsmessungen im infraroten Spektralbereich die direkten Auswirkungen der Retinalisomerisierung auf die Proteinumgebung zu beobachten. Die Vielzahl ausgeprägter Differenzbanden, die direkt nach Anregung beobachtet wurden bzw. sich teilweise mit einer 0,5 ps Zeitkonstante noch bildeten oder verstärkten, zeigte, dass neben der schnellen Isomerisierung auch der Energietransfer der im Retinal gespeicherten Überschussenergie an das Protein sehr effizient ist. Die nachfolgend mit 13 ps beobachtete Abnahme des Differenzsignals hat einen besonders großen Einfluss auf die C=C- sowie C=N-Streckschwingung des Retinals. Es liegt daher nahe, dass diese Komponente einen Kühlprozess beschreibt, bei dem die schwingungsangeregten Grundzustandspopulationen im all-*trans*-Ausgangszustand sowie im 13-*cis*-Photoprodukt Energie an die Umgebung des Retinals, sprich Protein und funktionelle Wassermoleküle, abgeben, was zur Absenkung der intramolekularen Temperatur führt. Dass dieser Prozess in ChR-2 im Gegensatz zur bakteriellen Protonenpumpe PR einerseits nicht sehr ausgeprägt ist und andererseits auch deutlich schneller abläuft, weist wiederum auf die effiziente Energieumverteilung in ChR-2 hin. Für weitergehende Aussagen auf molekularer Ebene fehlt jedoch eine exaktere Bandenzuordnung.

Die über Blitzlichtphotolyse gemessene Langzeitdynamik des ChR-2-Photozyklus zeigte eine für Retinalproteine typische Abfolge von K-Intermediat, dem M-ähnlichen blau-verschobenen Intermediat P<sub>390</sub> sowie einem nachfolgenden Gleichgewicht aus rot-verschobenen Spezies. Die dynamischen Merkmale der jeweiligen Übergänge ergaben jedoch signifikante Abweichungen zu den Photozyklen der verwandten Retinalproteine. Beispielsweise erfolgt der Zerfall der P<sub>520</sub>-Spezies, die den angeregten Ausgangszustand repopuliert, ungewöhnlicherweise triphasisch. Auch die Dauer des kompletten Photozyklus ist mit etwa 5 s bei ChR-2 deutlich länger als bei den sensorischen Retinalproteinen. Die temperaturabhängige Untersuchung und nachfolgende Evaluation mit Hilfe der Eyring-Gleichung zeigte für alle temperaturabhängigen Schritte Aktivierungsenthalpien im Bereich von 50 kJ mol<sup>-1</sup>. Der Photozyklus wird daher durch entropische Faktoren bestimmt. Für die Bildung der deprotonierten Spezies wurden erwartungsgemäß keine signifikanten Beiträge der Entropie gefunden. Der der Kanalöffnung zugeschriebene Schritt zeigt hingegen eine positive Differenz zwischen der Entropie des Übergangszustands und des M-artigen-Intermediats. Die ersten zwei Komponenten der Grundzustandsrepopulation wiesen stark negative Aktivierungsentropien auf, was als Wiederherstellung der geordneten geschlossenen Konfiguration des Kanals interpretiert wurde. Die letzte Zeitkonstante wies im beobachteten Bereich zwischen 10°C und 30°C keine Abhängigkeit von der Temperatur auf. Dies kann mit der Annahme einer rauen Potentialhyperfläche erklärt werden, bei der die Barrieren unterhalb  $k_B T$  liegen. Da FTIR-Spektroskopie zeigen konnte, dass mit diesem Schritt auch die mit der Isomerisierung vollzogenen strukturellen Änderungen der Bindetasche rückgängig gemacht werden [313], liegt die Vermutung einer Reihe von sequenziellen Reorganisationsschritten nahe.

In einem letzten Ansatzpunkt wurde die Imidazol-Abhängigkeit der Langzeitdynamik des ChR-2-Photozyklus untersucht. Es zeigte sich, dass die Reaktionen um die De- und Reprotonierung stark von Imidazol beeinflusst wird. Neben der Beschleunigung der Reprotonierungsreaktion weist die unterschiedliche Zuordnung der Zeitkonstanten der Messreihen mit und ohne Imidazol auf einen veränderten Mechanismus der Schiffbasen-Protonierungsreaktionen hin. Es ist plausibel, eine Verstärkung des Histidin-Donor-Effekts durch das strukturell verwandte Imidazol anzunehmen. Ein molekularer Mechanismus kann aber auch hier aufgrund der bis dato ungelösten Kristallstruktur nicht aufgestellt werden.



# 9 Beeinflussung der Dynamik archaealer Retinalproteine

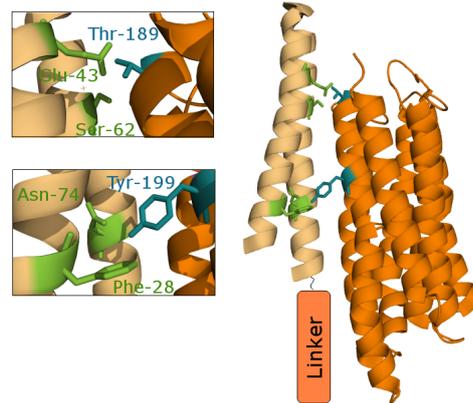
*Das Schönste, was wir erleben können,  
ist das Geheimnisvolle.*

Albert Einstein

## 9.1 Einleitung

Photosynthese, Phototaxis wie auch der osmotische Ausgleich der Zelle werden in Archaeen wie *Natronomonas pharaonis* oder *Halobacterium salinarum* lichtgesteuert durch Retinalproteine gewährleistet. Das sichtbare Absorptionsmaximum des Chromophors variiert dabei mit der Funktion des Proteins. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind vier Retinalproteine identifiziert worden: Bakteriorhodopsin (BR) [21, 131–133], Halorhodopsin (HR) [24–26], Sensorrhodopsin I (SRI) [350] und Sensorrhodopsin II (SRII) [350–352]. BR und HR sind lichtgetriebene Ionenpumpen, die Protonen bzw. Chloridionen über die Membran pumpen. Der von BR hergestellte Protonengradient wird von einer ATP-Synthase zur Energieerzeugung genutzt. HR dient hingegen dem osmotischen Ausgleich der Zelle. Der genaue Pumpmechanismus ist für BR in Kapitel 6 detailliert erläutert. Es wird daher hier nicht weiter darauf eingegangen. Die zwei sensorischen Proteine SRI und SRII vermitteln die Phototaxis, d.h., sie lenken die Bewegung der Bakterien abhängig von den Wellenlängen des eingestrahlt Lichts. Man unterscheidet hierbei positive und negative Phototaxis. Bei positiver Phototaxis bewegt sich der Organismus zu der Lichtquelle hin, bei negativer Phototaxis bewegt er sich von der Lichtquelle weg. In der archaealen Membran bilden die beiden sensorischen Retinalproteine jeweils Komplexe mit einem für die Signaltransduktion benötigten Protein, das aufgrund der Funktion des Signalüberträgers (lat.: traducere, übertragen) entsprechende als "halobacterial transducer", kurz HTr bezeichnet wird. Die Transducer durchspannen die Membran mit zwei transmembranen Helices (TM1 und TM2) und besitzen eine ausgedehnte 25 nm lange cytoplasmatische Domäne. Die spezifische Wechselwirkung zwischen dem sensorischen Rhodopsin und seinem Transducer wurde in einer Vielzahl von biologischen und spektroskopischen Studien untersucht. Hierbei konnte für SRII aus dem Organismus *Natronomonas pharaonis* (NpSRII) gezeigt werden, dass Asp-193 und Thr-204 [353] eine wesentliche Rolle für die beobachtete negative Phototaxis spielen. Diese sind aber nicht mit der Bindung des Transducers verknüpft. Mit dem Lösen der Kristallstruktur des NpSRII-HTrII<sub>1–114</sub>-Komplexes [354, 355] konnten zwei Wasserstoffbrücken-Paare zwischen Tyr-199<sup>SRII</sup> und Asn-74<sup>HtrII</sup> sowie Thr-189<sup>SRII</sup> und Glu-43<sup>HtrII</sup>/Ser-62<sup>HtrII</sup> identifiziert werden. Eine Vielzahl an

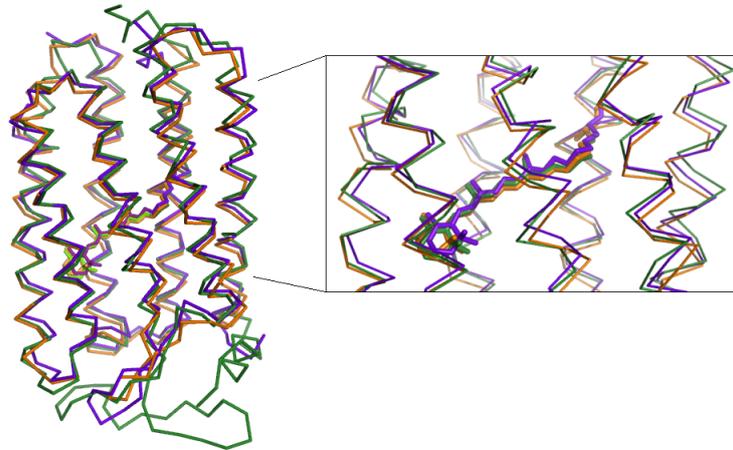
weitergehenden spektroskopischen Studien bestätigte diese Wasserstoffbrückenbindungen auch für die flüssige Phase [256, 353, 356–360]. Zudem wurde eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen Tyr-199<sup>SR<sub>II</sub></sup> und Phe-28<sup>H<sub>Tr</sub>II</sup> angenommen [361]. Schlussendlich konnten NMR, EPR, FRET und kalorimetrische Studien zudem zeigen, dass NpSR<sub>II</sub> auch mit der sogenannten Linkerregion am cytoplasmatischen Ende der transmembranen Helices des Transducers interagiert [357, 361–364]. Die cytoplasmatischen Domänen des Transducers



**Abbildung 9.1:** Kristallstruktur des NpSR<sub>II</sub> - HTr<sub>II</sub><sub>1-114</sub>-Komplexes (PDB-Datenbank: 1H2S) in der Cartoon-Darstellung. Links sind die für die Komplexierung wichtigen Aminosäuren in cyan (SR<sub>II</sub>) und grün (HTr) in vergrößerter Ansicht gezeigt. Die Linker-Region ist sinnbildlich als Rechteck mit eingezeichnet.

weisen große strukturelle Ähnlichkeit zu eukaryotischen Chemorezeptoren auf [365, 366], da beide sogenannte HAMP-Domänen (englische Bezeichnung für die konservierten Signalweitergabedomänen in **H**istidinkinasen, **A**denylylcyclasen, **m**ethyl-akzeptierenden Chemotaxisproteinen und **P**hosphatasen) besitzen. Der Großteil des cytoplasmatischen Teils dient der Kontrolle verschiedener Kinasen, die in die Signaltransduktionskaskade involviert sind. Am Ende der cytoplasmatischen Region wird ein ternärer Komplex mit den homodimeren Histidinkinasen CheA und CheW gebildet. Diese phosphorylieren CheY, das nun als Schalter für den Flagellenmotor fungiert. Die Signalweitergabe an den CheA/CheW-Komplex wird über die Methylsterase CheB und die Methyltransferase CheR reguliert [354, 367]. Der Mechanismus der Signalweitergabe ist Gegenstand derzeitiger Forschung. Für NpSR<sub>II</sub> konnte gezeigt werden, dass sich in den der Retinalisomerisierung anschließenden Reaktionsschritten Helix F des Retinalproteins nach außen dreht, was eine Drehung der Transmembranhelix TM2 des Transducers verursacht [361, 364, 367–371]. Diese konformationelle Änderung wird über die (coiled-coil) Helixstruktur des Transducers zum cytoplasmatischen Ende des HTr-Proteins weitergegeben, wo die Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt wird. Der Mechanismus wird in der Literatur diskutiert, da in den Kristallstrukturen der Intermediate, die in diesen Prozess involviert sind, keine Bewegung von Helix F nachgewiesen werden konnte [355]. Dies kann aber auf Kristallpackungseffekte zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zur funktionellen Diversität zeigen die Kristallstrukturen der archaealen Retinalproteine (gelöst sind bis jetzt BR aus *Halobacterium salinarum*, sowie HR und SRII aus dem Organismus *Natronomonas pharaonis*) eine sehr hohe Übereinstimmung [34–36]. Die sieben transmembranen Helices bilden eine Pore, die der über eine Schiffbase an einen Lysinrest kovalent gebundene Retinalchromophor in zwei Halbkanäle aufspaltet. Abbildung 9.1 verdeutlicht nochmals die exzellente Übereinstimmung der  $C_\alpha$ -Stränge von NpSRII, BR und HR. Neben den erwarteten Diskrepanzen im Bereich des N- und C-Terminus, sind nur im die Helices B und C verbrückenden Loop größere Abweichungen zu sehen. Wie in Abbildung 9.2 erkennbar ist, liegt der Retinalchromophor in allen Fällen



**Abbildung 9.2:** Überlagerung der  $C_\alpha$ -Stränge und des Retinal der Kristallstrukturen von HsBR (violett, PDB-Datenbank: 1C3W), NpSRII (orange, PDB-Datenbank: 1H68) und NpHR (grün, PDB-Datenbank: 3A7K). Signifikante Abweichungen sind lediglich im BC-loop sowie an den N- und C-Termini sichtbar.

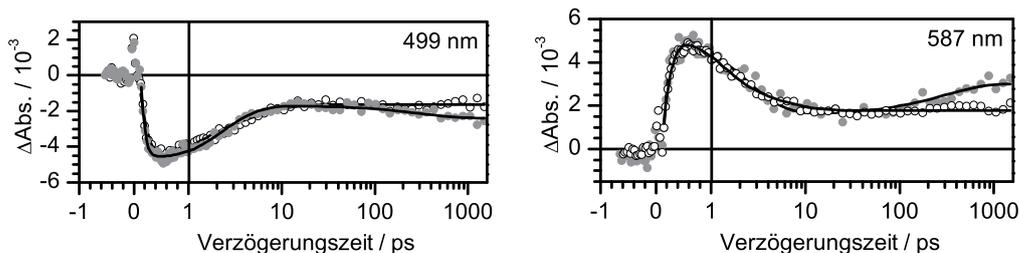
in der *all-trans* Konfiguration vor. Der Photozyklus der archaealen Retinalproteine wird stets mit der *all-trans* nach *13-cis* Isomerisierung gestartet, was zu der Bildung des ersten Grundzustandsintermediats K führt. Für diese sogenannte Primärdynamik wurden signifikante Unterschiede zwischen den archaealen Rhodopsinen beobachtet. Während BR und SRII aus den Organismen *Halobacterium salinarum* und *Natronomonas pharaonis* eine schnelle und monophasische Deaktivierung ( $< 0,5$  ps) des angeregten Zustands aufweisen [157, 164, 165, 168, 172, 174, 346–349], wird der angeregte Zustand von HsSRI [174] und NpHR [372–375] wesentlich langsamer und biexponentiell depopuliert (SRI: 5 ps, 33 ps; HR: 2 ps, 7 ps). Auch die nachfolgenden Intermediate, die analog zur BR-Notation mit L, M, N und O bezeichnet werden, weisen deutlich unterschiedliche zeitliche Charakteristika auf. Dabei spiegeln sie die Funktionen der Retinalproteine wieder. Für die Ionenpumpen BR und HR werden schnelle Turn-over-Raten beobachtet, während die Sensoren einen sehr langen Photozyklus aufweisen ( $\tau_{TO}(\text{BR}) = 10$  ms,  $\tau_{TO}(\text{HR}) = 14$  ms,  $\tau_{TO}(\text{HsSRI}) = 750$  ms,  $\tau_{TO}(\text{NpSRII}) = 1,2$  s) [16, 376–378]. Zudem weist das M-Intermediat bei den sensorischen Retinalproteinen eine wesentlich längere Lebensdauer

als bei den Ionenpumpen auf ( $\tau_M(\text{BR}) = 2\text{-}3\text{ ms}$ ,  $\tau_M(\text{NpSRII}) = 400\text{ ms}$ ), was direkt mit der Signalübertragung verknüpft werden kann. Die Photozyklen können bei allen Retinalproteinen durch Mutationen an den analogen Positionen des Protonendonors (BR: Asp-96) und des Protonenakzeptors, der gleichzeitig das Gegenion zur protonierten Schiffbase (Asp-85) bildet, beeinflusst werden. Für diese Arbeit relevant sind hierbei vor allem die Protonenakzeptormutanten von BR und NpSRII. In BR hat der Austausch des geladenen Asp-85 gegen ein Asn dramatische Auswirkungen auf das Absorptionsmaximum, das eine Rotverschiebung um  $\approx 30\text{ nm}$  aufweist [379, 380]. Zudem erniedrigt sich der  $\text{pK}_A$ -Wert der Schiffbase von einem Wert um 13 für das Wildtyp-Protein auf einen Wert von  $\approx 8.6$  in der D85N Mutante [339]. Bei physiologischem pH-Wert liegen daher mit der deprotonierten Schiffbase  $\lambda_{max} = 410\text{ nm}$  und protonierten Schiffbase  $\lambda_{max} \approx 600\text{ nm}$  zwei unterschiedliche Chromophorkonfigurationen vor. Auch die Protonenpumpaktivität wird deutlich durch diese Mutation beeinflusst. Durch Anregung der Population mit protonierter Schiffbase, wie sie im Wildtyp-Protein vorliegt, konnte keine Pumpaktivität beobachtet werden [379]. Dies ist im Photozyklus in dem Sinne wiedergespiegelt, dass nach Anregung bei neutralem pH-Wert nur zwei Intermediate mit rotverschobenem Absorptionsmaximum beobachtbar sind [381]. Jedoch erzeugt die deprotonierte Form unter kontinuierlichem Blaulicht nach außen gerichtete stationäre Photoströme, die signifikant durch die Zugabe von Azid erhöht werden können. Zusätzliche ansteigende Intensitäten an gelbem Licht führen in einem zwei-Photonenprozess zur Umkehr der Pumprichtung [382]. Auch die photophysikalischen Eigenschaften der NpSRII D75N-Mutante zeigen drastische Abweichungen zum Wildtyp-Protein. Das Absorptionsmaximum des Retinalchromophors ist in D75N wie auch schon bei der D85N-Mutante in BR im Vergleich zu NpSRII wt  $\approx 20\text{ nm}$  rotverschoben [342]. Die Isomerisierungsdynamik ist um einen Faktor zwei langsamer als im Wildtyp-Protein [330], was auf die veränderte Elektrostatik wie auch Variationen im Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk zurückgeführt werden kann. Das Fehlen eines stationären Punktes in den transienten Spektren zeigte zudem, dass die frühen Photoreaktion in der D75N-Mutante weitaus komplexer sind als bei NpSRII wt. Die Population von mindestens zwei K-Intermediaten wurde vorgeschlagen. Dies ist in Übereinstimmung mit optoakustischen Messungen von Losi et al. [383], die zwei verschiedene K-ähnliche Intermediate bestimmten, die sie  $K_E$  und  $K_L$  nannten. Auch Transient-Grating-Messungen wiesen auf mehrere spektral stille K-Intermediate hin [384]. Der ms-Photozyklus ist dem des Wildtyp-Proteins bei pH-Werten  $> 5,5$  sehr ähnlich. Schmies et al. beobachteten über Blitzlichtphotolyse ein K-Intermediat sowie ein Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen (vermutlich N- und O-ähnlich), die bei  $565\text{ nm}$  und  $520\text{ nm}$  absorbieren [342]. Ein blau-verschobenes M-ähnliches Intermediat konnte nicht gefunden werden. Obwohl der kinetische Photozyklus dieses Intermediat nicht aufweist, zeigt die D75N-Mutante jedoch photophobische Reaktionen auf grün-blaues Licht [364]. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass das Vorhandensein des M-Zustands keine Voraussetzung der molekularen Aktivierung des Transducer-Proteins ist [384]. Auch der Einfluss von Protonenakzeptor-Mutationen auf die Signalling-Eigenschaften des Rezeptors wurde untersucht [385]. Es zeigte sich, dass die Komplexe aus den NpSRII Asp-75-Mutanten D75A, D75N und D75Q und dem

Transducer aus dem Organismus *Natronomonas pharaonis* ähnlich hohe Sensitivität auf Photostimuli wie das Wildtyp-Protein aufweisen. Der Komplex der D75Q-Mutante mit dem Transducer aus *Halobacterium salinarum* verhält sich hingegen konstitutiv aktiv, was die Transducer-Selektivität hervorhebt.

## 9.2 Der Einfluss von Azid auf die Primärdynamik

Frühere Messungen [330, 386] an der D75N-Mutante von NpSR<sub>II</sub> machten deutlich, dass die Zugabe von 100 mM Azid einen signifikanten Einfluss auf die Primärdynamik hat. Es zeigte sich, dass die sub-10 ps-Dynamik fast auf Wildtyp-Bedingungen beschleunigt wurde. Zu längeren Verzögerungszeiten wurde zudem ein weiterer spektraler Übergang sichtbar. Die positiven Absorptionsänderungen um 590 nm zeigten einen weiteren Anstieg mit etwa 200 ps. Diese Kinetik war auch bei 500 nm in der negativen Bande des ausgebleichten Grundzustands erkennbar. Dieser Befund wurde einem bereits in der Literatur beschriebenen  $K_1$  nach  $K_2$ -Übergang zugeschrieben, der nach der Zugabe von Azid im Beobachtungsfenster der durchgeführten Messung liegt.



**Abbildung 9.3:** Transiente Absorptionsänderungen von NpSR<sub>II</sub> D75N mit (●) und ohne (○) Azid. Die Signale im Bereich des Grundzustandsbleichens (499 nm, links) sowie der Absorption des Photoprodukts (587 nm, rechts) sind dargestellt. Die durchgezogenen Linien repräsentieren jeweils den globalen Fit.

Dieser Befund war bis dato unbekannt. Hingegen ist der Einfluss von Azid auf die De- und Reprotonierungsreaktionen der Schiffbase im Photozyklus von BR ein gut untersuchtes Themengebiet [300, 337, 340, 344]. In der Literatur werden für die beobachtete Beschleunigung zwei Mechanismen diskutiert. Der erste, sogenannte Shuttle-Mechanismus führt die Wirkung von Azid auf die Annahme zurück, dass sich Azid zwischen der Schiffbase und dem Bulkwasser hin und herbewegt [216, 345]. Die zweite Erklärung schreibt die Funktionalität der Änderung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks der Retinalbindetasche zu [336]. Der nachfolgende Abschnitt befasst sich mit der Frage, ob dieser Effekt spezifisch für die untersuchte Mutante ist, oder ob die Primärdynamik anderer Retinalproteine auch durch Azid beeinflussbar ist. Um dies zu beantworten wurden Messungen an SR<sub>II</sub> wt, BR wt und der primären Protonenakzeptormutante BR D85N durchgeführt. Hierbei wurde jeweils eine Probe mit und ohne 100 mM Azid unter den gleichen Bedingungen gemessen um eine direkte Vergleichbarkeit zu erhalten. Die erzielten Ergebnisse sind Teil der folgenden Publikation:

Verhoefen, M.-K., Lenz, M.O., Amarie, S., Klare, J.P., Tittor, J., Oesterhelt, D., Engelhard, M. und Wachtveitl, J. *Primary Reaction of SRII Mutant D75N and the Influence of Azide* Biochemistry (2009), **48**: 9677-9683.

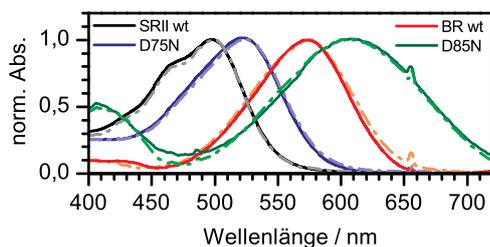
### Experimentelle Vorgehensweise

Die NpSRII-D75N-Mutante sowie das Wildtyp-Protein wurden wie in nachfolgenden Referenzen beschrieben [342, 387] exprimiert. Die Expression von BR und der BR D85N-Mutante ist in Referenz [339] publiziert. Die Proben lagen alle in 0,1% n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert vor. Die Messungen wurden in 10 mM Tris-Puffer bei pH 8,0 mit 500 mM NaCl durchgeführt. Den Azid-Proben wurde 5 M  $\text{NaN}_3$ -Stammlösung zugeführt, sodass eine Endkonzentration von etwa 100 mM Azid erhalten wurde. Alle Proben hatten bei einer Schichtdicke von 1 mm eine optische Dichte von  $\approx 0,5$  im Absorptionsmaximum.

Für die Ultrakurzzeitmessungen wurde der in Kapitel 3.4.1 beschriebene Aufbau benutzt. Die Anregungswellenlängen wurden mit Hilfe des NOPAs generiert. Für die Messung von SRII wt wurde eine Wellenlänge von 500 nm eingestellt, für NpSRII D75N 520 nm. Die BR wt- und BR D85N-Probe wurden mit Pulsen einer Zentralwellenlänge von 600 nm angeregt. Die Anregungsenergien lagen jeweils bei  $\approx 50$  nJ. Breitbandige Einzelfilament-Weißlichtabtastpulse wurden in Saphir (NpSRII D75N, BR und BR D85N) oder  $\text{CaF}_2$  (NpSRII wt) erzeugt. Die Anreg- und Abtastpulse waren parallel zueinander polarisiert.

### UV-vis-Absorptionsspektroskopie

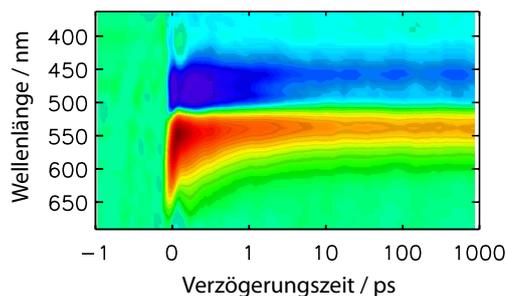
Die in Abbildung 9.4 dargestellten Absorptionsspektren zeigen die signifikante Rotverschiebung des Absorptionsmaximums bei Mutation des primären Protonenakzeptors. Für NpSRII ist eine Verschiebung von 25 nm beobachtbar, für BR von 30 nm. Dies ist vornehmlich auf die Änderung der Elektrostatik in der Retinalbindetasche zurückzuführen. Vergleicht man die Absorptionsspektren vor und nach Zugabe von Azid, so ist nahezu kein Unterschied sichtbar.



**Abbildung 9.4:** Normierte Absorptionsspektren von NpSRII wt (schwarz), NpSRII D75N (blau), BR wt (rot), BR D85N (grün). Die signifikante Rotverschiebung nach Punktmutation des primären Protonenakzeptors ist deutlich erkennbar. Die gute Übereinstimmung der Spektren ohne (durchgezogene Linien) und mit (strichpunktierte Linien) Azid zeigt, dass die Zugabe von Azid keinen Einfluss auf die Absorptionseigenschaften der Proben hat.

### Transiente Absorptionsmessungen an SR wt

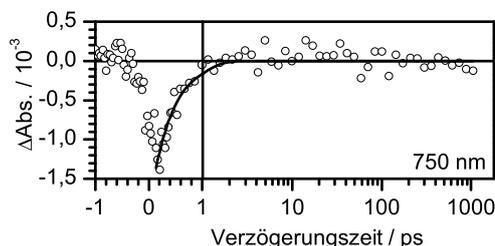
Die nach Photoanregung auftretende Kurzzeitdynamik wurde für NpSRII mit und ohne Azid zwischen 370 nm und 690 nm aufgenommen. Zur Übersicht sind die erhaltenen Absorptionsänderungen der Azid-haltigen Probe in Abbildung 9.5 gezeigt. Blau sind hierbei negative Absorptionsänderungen dargestellt, rot positive Differenzbanden. In grün eingefärbte Bereiche weisen keine signifikanten Absorptionsänderungen auf. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear skaliert, hiernach logarithmisch.



**Abbildung 9.5:** Transiente Absorptionsänderungen von NpSRII Azid nach Photoanregung bei 500 nm. Die Hauptbeiträge entsprechen dem Grundzustandsbleichen sowie einer Überlagerung aus der Absorption des angeregten Zustands (frühe Verzögerungszeiten) und des Photoprodukts.

Um 480 nm ist mit dem Zeitnullpunkt eine negative Signatur sichtbar, die auf das Ausbleichen des Grundzustands zurückgeführt werden kann. Rotverschoben hierzu ist eine positive Bande beobachtbar. Zu kurzen Verzögerungszeiten kann diese der Absorption des angeregten Zustands zugeschrieben werden. Die Bande zerfällt dominant mit einer Zeitkonstante von 0,35 ps. Hiernach ist ein weiterer Abfall auf einer Pikosekundenzeitskala zu beobachten. Bei Verzögerungszeiten  $> 10$  ps ist keine weitere Dynamik erkennbar. In einer anderen Messung, in der der Abtastbereich weiter im nIR lag, konnten bei Wellenlängen größer als 720 nm schwach negative Signale der stimulierten Emission beobachtet werden (Abbildung 9.6), die auf einer 0,4 ps-Zeitskala zerfallen.

Ein globaler Fit der transienten Absorptionsänderungen für Verzögerungszeiten größer 0,15 ps ergibt, dass die Daten mit vier Zeitkonstanten optimal angepasst werden kön-



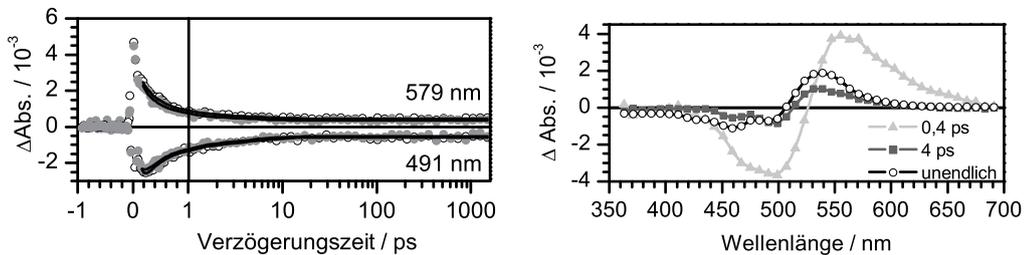
**Abbildung 9.6:** Transiente Absorptionsänderungen von NpSRII (○) nach Anregung bei 500 nm im Bereich der stimulierten Emission. Die durchgezogene Linie repräsentiert den Einzelkanalfit. Es ist deutlich erkennbar, dass die stimulierte Emission mit einer Zeitkonstante von  $< 0,5$  ps zerfällt.

	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_\infty$
NpSRII mit/ohne Azid	<0,15	0,35-0,4	3-4	unendlich
NpSRII nach Lutz et al. [174]	<0,15	0,4	5	unendlich

**Tabelle 9.1:** Zeitkonstanten der Anpassung der transienten Absorptionsmessungen von NpSRII im sichtbaren Spektralbereich. Da für die Messung mit und ohne Azid keine Abweichungen zu beobachten waren, ist für die Zeitkonstanten jeweils der Bereich der Werte angegeben, die die Anpassung der Datensätze lieferte. Zum Vergleich sind bereits von Lutz et al. [174] publizierte Werte einer Messung ohne Azid angegeben.

nen. Die erhaltenen Zeitkonstanten sind in Tabelle 9.1 angegeben. Ein Vergleich der Zerfallskonstanten mit bereits publizierten Werten von Lutz et al. [174] zeigt exzellente Übereinstimmung. Die kürzeste Zeitkonstante wird dabei im Folgenden nicht diskutiert, da sie aufgrund der guten Zeitauflösung dieses Experiments Teile der beobachteten oszillatorischen Beiträge beinhaltet.

Analog zur Interpretation von Lutz et al. [174] kann der mit  $\tau_2$  assoziierte Prozess der Deaktivierung des angeregten Zustands zugeordnet werden.  $\tau_3$  beschreibt hingegen einen Kühlprozess schwingungsangeregter Grundzustandspopulationen, bei dem sowohl der all-*trans*-Retinal-Zustand rückgebildet als auch die relaxierte 13-*cis*-Photoproduktsignaturen populiert wird. Wie die exemplarisch gewählten Absorptionsänderungen bei 491 nm und 579 nm in Abbildung 9.7 zeigen, stimmen die transienten Absorptionsänderungen mit und ohne Azid perfekt überein. Ein Einfluss von Azid auf die Primärdynamik von NpSRII ist daher für den sub-ns-Zeitbereich auszuschließen.

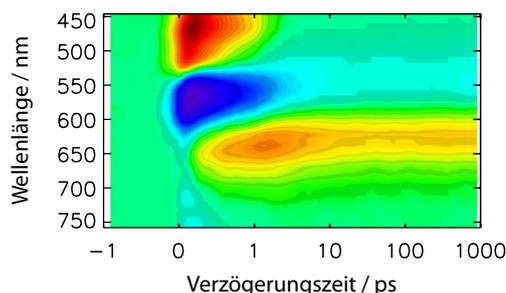


**Abbildung 9.7:** Transiente Absorptionsänderungen von NpSRII ohne ( $\circ$ ) und mit Azid ( $\bullet$ ) im Bereich des Grundzustandsbleichens (491 nm) sowie der Absorption des angeregten Zustands und des Photoprodukts (579 nm). Schon die Rohdaten zeigen, dass die Dynamik für beide Proben identisch ist. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit. Die zerfallassozierten Spektren der letzten drei Zeitkomponenten der globalen Anpassung sind in der rechten Abbildung gegeben.

## Transiente Absorptionsmessungen an BR wt

Für die BR-Proben mit und ohne Azid wurden transiente Absorptionsänderungen zwischen 450 nm und 750 nm aufgenommen. Abbildung 9.8 stellt die erhaltenen Differenzsignale für die azidhaltige BR wt-Probe dar. Die Farbkodierung und x-Achsen-Skalierung ist dabei analog zu Abbildung 9.5.

Um 570 nm ist eine negative Absorptionsänderung beobachtbar, die auf das Ausbleichen des Grundzustands zurückgeführt werden kann. Die Bande bildet sich mit Photoanregung und schiebt während der ersten 10 ps zu kürzeren Wellenlängen. Hierbei zerfällt sie mit 0,5 ps und 3 ps. Blau- und rot-verschoben zum Grundzustandsbleichen sind positive Signaturen sichtbar. Die Bande um 480 nm ist mit dem Zeitnullpunkt beobachtbar und zerfällt hauptsächlich mit einer sub-Pikosekunden-Komponente. Sie kann der Absorption des angeregten Zustands zugeordnet werden. Die positive Bande um 620 nm wird mit einer schnellen Zeitkomponente von etwa 200 fs gebildet, erreicht ihr Maximum bei 1 ps und zeigt dann einen Zerfall mit 3 ps. Die Bande wird der Absorption des schwingungsheißen und relaxierten Photoprodukts zugeschrieben. Bei Wellenlängen  $>650$  nm ist das negative Signal der stimulierten Emission zu erkennen. Dieses zerfällt auf der gleichen Zeitskala wie die Absorption des angeregten Zustands. Bei Verzögerungszeiten  $>10$  ps ist im ganzen beobachteten Wellenlängenbereich keine Dynamik mehr erkennbar.



**Abbildung 9.8:** Transiente Absorptionsänderungen von BR mit Azid nach Photoanregung bei 600 nm. Die Hauptkomponenten stammen von der Absorption des angeregten Zustands, dem Grundzustandsbleichen, der Photoproduktabsorption sowie der stimulierten Emission.

Zur Interpretation der Daten wurden diese in einer globalen Fitroutine mit einer Summe an Exponentialfunktionen angepasst. Die Anpassung wurde für Verzögerungszeiten  $>0,15$  ps durchgeführt. Hierdurch kann davon ausgegangen werden, dass Reste des kohärenten Artefakts nicht mitgefittet werden. Die Fitroutine zeigte, dass die Daten optimal mit vier Zerfallskomponenten angepasst werden können. Die erhaltenen Zerfallszeiten stimmen mit Literaturwerten überein (Tabelle 9.2).

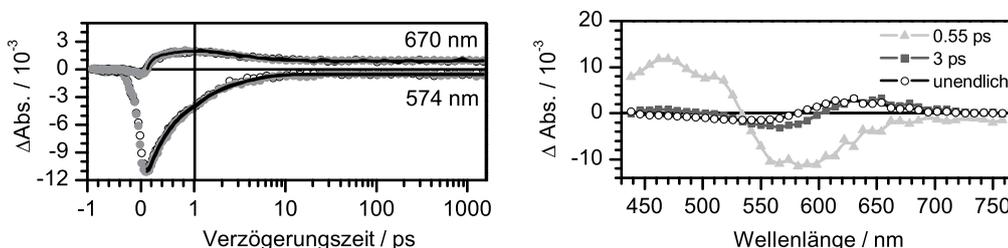
Die kürzeste Zeitkonstante von  $<0,2$  ps kann jedoch aufgrund des eingeschränkten Fitbereichs nicht interpretiert werden. Die zerfallenssoziierten Spektren in Abbildung 9.9 zeigen, dass der mit  $\tau_2$  assoziierte Prozess den Zerfall des angeregten Zustands beschreibt. Die Ähnlichkeit der Amplitudenspektren von  $\tau_3$  und  $\tau_\infty$  legt dar, dass ein Kühlprozess der Deaktivierung des angeregten Zustands angeschlossen ist.  $\tau_\infty$  spiegelt das transiente

	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_\infty$
BR mit/ohne Azid	<0,15	0,5-0,55	3-3,5	unendlich
BR Literatur	0,1 - 0,2	0,5	3-5	unendlich

**Tabelle 9.2:** Zeitkonstanten der Anpassung der transienten Absorptionsmessungen von BR im sichtbaren Spektralbereich. Da für die Messung mit und ohne Azid keine Abweichungen zu beobachten waren, ist für die Zeitkonstanten jeweils der Bereich der Werte angegeben, die die Anpassung der Datensätze lieferte. Zum Vergleich sind die für BR Proben ohne Azid publizierten Werte gegeben [164, 165, 168, 172, 346–349].

Spektrum bei 1,5 ns wieder, das das BR<sub>K</sub>-BR Differenzspektrum darstellt.

Die transienten Absorptionsänderungen der Einzelwellenlängen sind im Rahmen des Fehlers identisch, die Primärdynamik von BR wird somit nicht durch die Zugabe von Azid beeinflusst.

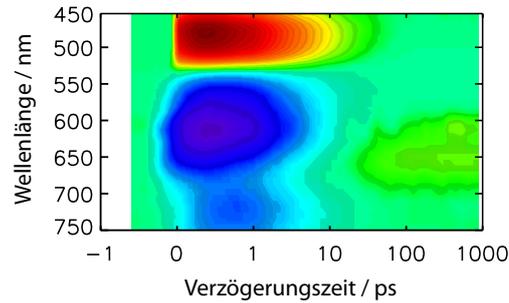


**Abbildung 9.9:** Transiente Absorptionsänderungen von BR ohne (○) und mit Azid (●) im Bereich des Grundzustandsbleichens (575 nm) sowie der Absorption des Photoprodukts (670 nm). Eine sehr hohe Übereinstimmung der Datensätze mit und ohne Azid ist erkennbar. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit. Die zerfallenspektren der letzten drei Zeitkomponenten dieser globalen Anpassung sind exemplarisch für die azidhaltige Probe in der rechten Abbildung gegeben.

### Transiente Absorptionsmessungen an BR D85N

Die photoinduzierte Kurzzeitdynamik der azidhaltigen BR D85N-Probe ist in Abbildung 9.10 für einen Wellenlängenbereich von 450 nm bis 750 nm dargestellt. Die prinzipielle Farbkodierung ist auch hier analog zu den Abbildungen 9.5 und 9.8 gewählt.

Für Wellenlängen kleiner 520 nm ist eine breite positive Differenzbande beobachtbar, die der Absorption des angeregten Zustands zugeschrieben werden kann. Die Bande entsteht direkt mit Anregung und zerfällt auf einer 20 ps Zeitskala. Um 550 nm ist das negative Signal des Grundzustandsbleichens erkennbar. Das Signal überlagert stark mit der Absorption des K-Photoprodukts, das im Differenzspektrum sein Maximum bei 650 nm hat. Dies hat zur Folge, dass bei langen Verzögerungszeiten nur ein sehr geringes Differenzsignal erkennbar ist. In der roten Flanke des Spektrums ist eine weitere negative Charakteristik beobachtbar. Diese ist der stimulierten Emission zuzuordnen. Die Bande zerfällt auf der gleichen Zeitskala wie die Absorption des angeregten Zustands.



**Abbildung 9.10:** Transiente Absorptionsänderungen der azidhaltigen BR D85N Probe nach Photoanregung bei 600 nm. Die breiten positiven und negativen Differenzbanden stammen zu frühen Verzögerungszeiten von der Absorption des angeregten Zustands, dem Grundzustandsbleichen sowie der stimulierten Emission. Die nach etwa 10 ps sichtbare positive Bande kann der Absorption des K-Photoprodukts zugeschrieben werden.

Zur weiteren Analyse wurden die Daten ab 0,15 ps einer globalen Fitanalyse unterzogen. Es zeigte sich, dass eine Anpassung mit vier Zeitkonstanten ein optimale Beschreibung der Daten liefert (Tabelle 9.3). Die kürzeste Zeitkonstante wird hier nicht weiter interpretiert, da sie im Bereich der Zeitauflösung liegt. Die erhaltenen Zerfallskomponenten von 0,2 ps, 1,2 ps und 12 ps stimmen gut mit publizierten Werten von Logunov et al. [157] überein.

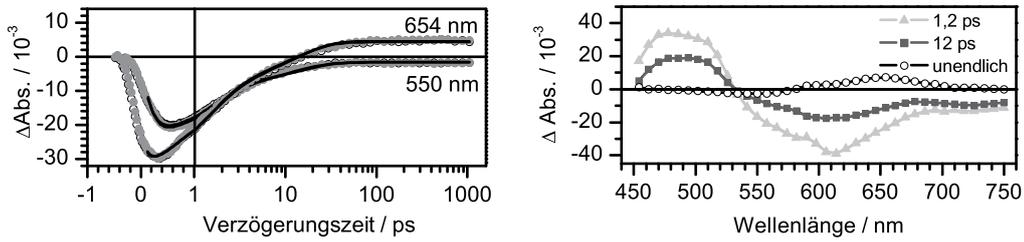
Die Amplitudenspektren weisen darauf hin, dass der angeregte Zustand biexponentiell mit den Komponenten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  zerfällt. Die geringe Amplitude von  $\tau_\infty$  weist nochmals darauf hin, dass sich das Grundzustandsspektrum und das K-Photoproduktspektrum nahezu aufheben. Der Vergleich der Einzeltransienten im Bereich des Grundzustandsbleichens und der Photoproduktabsorption (Abbildung 9.11) zeigen, dass Azid auch auf die Isomerisierungsdynamik der BR D85N-Mutante kein Einfluss hat.

	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_\infty$
BR D85N mit/ohne Azid	<0,15	1,2-1,5	12-13	unendlich
BR D85N [157]	-	2,2	13	unendlich

**Tabelle 9.3:** Zeitkonstanten der Anpassung der transienten Absorptionsmessungen von BR D85N im sichtbaren Spektralbereich. Wie für die Messungen an NpSR11 und BR sind auch für die BR D85N-Mutante für die Zeitkonstanten jeweils der Bereich der Werte angegeben, die die Anpassung der Datensätze mit und ohne Azid lieferte. Zum Vergleich sind die von Logunov et al. ermittelten Werte dargestellt.

## Diskussion

Der in dieser Arbeit beobachtete Verlauf der Primärdynamik von SR11 wt, BR wt und BR D85N entspricht der in der Literatur beschriebenen Charakteristik [157, 157, 164, 165, 168, 172, 174, 346–349]. Nach Anregung ist eine sehr schnelle Dynamik von 100-200 fs beobachtbar, die im Bereich der Zeitauflösung des Experiments liegt. Diese



**Abbildung 9.11:** Transiente Absorptionsänderungen der BR D85N-Mutante ohne ( $\circ$ ) und mit Azid ( $\bullet$ ) im Bereich des Grundzustandsbleichens (550 nm) sowie der Absorption des Photoprodukts (654 nm). Die exemplarisch gewählten Transienten zeigen jeweils ein im Signal-zu-Rausch-Verhältnis identisches Signal. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die globale Anpassung. Die zerfallenssoziierten Spektren der letzten drei Zeitkonstanten des Fits sind für die BR D85N-Probe mit Azid in der rechten Abbildung gegeben.

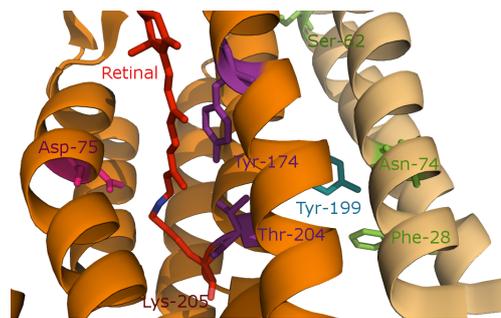
entspricht einer Wellenpaketsbewegung aus dem Franck-Condon-Bereich heraus und verläuft hauptsächlich über die C=C-Streck-Koordinate (Siehe Kapitel 6 auf Seite 61 und Referenzen hierin). NpSR II und BR weisen eine sehr schnelle Deaktivierung des angeregten Zustands im Bereich von 300-500 fs auf. Hiernach folgt ein Kühlprozess, bei dem die heißen  $S_0$ -Populationen des isomerisierten 13-*cis*-Photoprodukts und des all-*trans*-Grundzustands relaxieren. Der Zerfall des angeregten Zustands ist hingegen bei der BR D85N-Mutante deutlich verlangsamt. Dies ist ein allgemein bekanntes Phänomen von Mutanten des primären Protonenakzeptors. In der Literatur wird es damit erklärt, dass sich die  $S_1$ -Potentialfläche durch die veränderte Elektrostatik sowie das modifizierte Wasserstoffbrückennetzwerk der Mutanten [282, 286, 347, 388, 389] so ändert, dass der Zugang zu einer konischen Durchschneidung nicht mehr direkt vorhanden ist [390, 391]. Zudem weisen die Amplitudenspektren in Abbildung 9.11 darauf hin, dass der  $S_1$ -Zustand bei der BR D85N-Mutante durch zwei Komponenten ( $\tau_2$  und  $\tau_3$ ) entvölkert wird. Dieser biexponentielle Zerfall kann durch eine weitere Barriere in der  $S_1$ -Potentialfläche erklärt werden. Ein solcher Zerfall ist für Retinalproteine nicht ungewöhnlich und wurde bereits in Untersuchungen der Primärreaktion von Halorhodopsin [372–375], Sensorrhodopsin I [174] sowie Proteorhodopsin [272, 273, 279] beobachtet.

Die in dieser Studie durchgeführten Messreihen an NpSR II-, BR- und BR D85N-Proben mit und ohne Azid erlauben die direkte Untersuchung des Azideffekts auf die Primärdynamik. Es stellte sich heraus, dass die sub-Nanosekunden-Photodynamik dieser archaealen Proteine im Gegensatz zur NpSR II D75N-Mutante nicht von Azid beeinflusst wird. Der in dieser Mutante beobachtete Einfluss des externen Donors Azid muss daher spezifisch für diese Mutation sein. Die bei der D75N-Mutante beobachteten dynamischen Änderungen sind wahrscheinlich auf die Auswirkungen der bei neutralem pH-Wert negativ vorliegenden Azid-Anionen auf das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk zurückzuführen [336], bei dem möglicherweise ein Teil der negativen Ladung des Gegenions zur Schiffbase wiederhergestellt wird. Da NpSR II wt diesen Effekt nicht aufweist, sollten sich die strukturellen Gegebenheiten der Mutante deutlich vom NpSR II-Wildtyp-Protein unterscheiden.

Tatsächlich konnte dies durch Tieftemperatur-Experimente von Hein et al. [392] bestätigt werden. Diese konnten zeigen, dass sich die Amid I-Änderungen und die temperaturabhängige Quantenausbeute der Photoproduktbildung signifikant unterscheiden. Dies wurde auf unterschiedliche Konformationen im Dunkelzustand zurückgeführt.

### 9.3 Retinalisomerisierung im Sensorrhodopsin II-Transducer II-Komplex

Bereits frühere Studien konnten zeigen, dass die strukturellen Auswirkungen der Retinalisomerisierung bei NpSR II signifikant vom Vorhandensein des Transducers abhängen. Der größte Einfluss konnte hierbei für den Teil der Retinalbindetasche nachgewiesen werden, die in unmittelbarer Nähe der Transducerbindungsstelle liegt. Es zeigte sich, dass die Wasserstoffbrücke zwischen Thr-204 auf Helix G und Tyr-174 auf Helix F in Anwesenheit des Transducers signifikant verstärkt wird, während sie in Abwesenheit des Transducers unbeeinflusst ist [356]. Es wurde daher vermutet, dass die Veränderungen dieser Wasserstoffbrückenbindung im weiteren Verlauf des Photozyklus eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung spielt. In der Tat konnten Sudo und Spudich zeigen, dass die beiden beteiligten Seitenketten essentiell für eine funktionierende Phototaxis sind [393]. Dieser frühe Einfluss des Transducers stellt die Verbindung zwischen der Photoisomerisierung des Chromophors und den späteren Konformationsänderungen im Protein dar, die zur Aktivierung des Transducers führen. Im Folgenden soll daher die Isomerisierungsdynamik des NpSR II-NpHTr-Komplex polarisationsabhängig untersucht werden und mit bereits publizierten Ergebnissen des sensorischen Proteins ohne Transducer verglichen werden.



**Abbildung 9.12:** Ausschnitt aus der Kristallstruktur des NpSR II-HTr II<sub>1-114</sub>-Komplexes (PDB-Datenbank: 1H2S). Helices D und E sind übersichtshalber nicht dargestellt. In der Stäbchenform sind neben dem mit Lys-205 kovalent verknüpften Retinal (rot) und dem Gegenion der Schiffbase Asp-75 (magenta) die für die Signalweitergabe wichtigen Seitenketten von Thr-204 und Tyr-174 (violett) gezeigt. In grün und cyan sind Teile der für die Transducer-Komplexierung verantwortlichen Aminosäuren eingezeichnet.

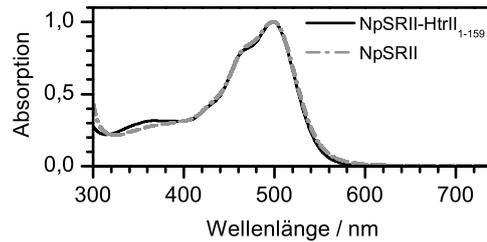
## Experimentelle Vorgehensweise

Zur Untersuchung der Primärdynamik wurden Kurzzeitmessungen an dem Komplex aus NpSR<sub>II</sub> und dem N-terminalen Fragment des NpHTr Transducers bestehend aus den Aminosäuren 1-157 durchgeführt. Der NpSR<sub>II</sub>-HTr<sub>II</sub><sub>1-157</sub>-Komplex wurde wie in nachfolgender Referenz beschrieben [394] hergestellt. Die Probe lag in 0,1% n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert vor. Die Messungen wurden in 10 mM Tris (HCl) bei pH 8,0 mit 500 mM NaCl durchgeführt. Gemessen in einer 1 mm dicken Quarzküvette hatten die Proben eine optische Dichte von  $\approx 0,5$  im Absorptionsmaximum.

Die transienten Absorptionsmessungen wurden mit dem in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Aufbau durchgeführt. Zur Anregung der Probe wurde der NOPA auf 495 nm eingestellt. Die Benutzung eines Prismenkompressors ergab Pulsauern von etwa 100 fs. Am Probenort wurde eine Pulsenergie von 30 nJ eingestellt. Abgetastet wurde mit Weißlicht-Pulsen, die in einem CaF<sub>2</sub>-Substrat erzeugt wurden. Hierbei konnte ein spektraler Bereich von 380 nm bis 700 nm abgedeckt werden. Die Auswertung wurde jedoch nur für einen Bereich von 410 nm bis 680 nm durchgeführt, da hier signifikante Differenzsignale beobachtet werden. Um polarisationsabhängige Informationen zu erhalten wurde in den Anregungsstrahlengang eine Verzögerungsplatte ( $\lambda/2$ ) eingebaut, die es ermöglichte die Polarisation des Anregungsstrahls zu drehen. Es wurden nacheinander Messungen in paralleler und senkrechter Polarisation von Anreg- und Abtastpuls durchgeführt. Die Messgeometrie wurde dabei nicht geändert. Essentiell für die Messreihe war die Stabilität des Weißlichts während der Messdauer. Da diese nicht während der Messung kontrolliert werden konnte, ist nicht klar, ob die Messungen unter paralleler und senkrechter Polarisation unter exakt gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Abweichungen der Signalamplitude und damit Fehler in den berechneten Anisotropiefaktoren sind daher nicht auszuschließen. Jedoch konnten UV-vis-Spektren der Probe vor und nach der Messreihe zeigen, dass die Probe während der Messungen nicht degradierte.

## UV-vis-Absorptionsspektroskopie

Abbildung 9.13 zeigt die UV-vis-Absorptionsspektren einer solubilisierten NpSR<sub>II</sub>-Probe im Vergleich zur Probe, bei der das Sensorrhodopsin-Protein mit seinem Transducer assoziiert ist. Beide Spektren weisen die in der Literatur beschriebene Feinstruktur der Absorptionscharakteristik des Retinalchromophors auf [316]. Das Hauptabsorptionsmaximum liegt in beiden Fällen bei etwa 500 nm, eine Schulter ist bei 470 nm zu beobachten. Im Bereich um 360 nm sind kleine Abweichungen festzustellen. Unterschiedliche Streulichtbeiträge sowie variierende Mengen an ungebundenem sowie gebundenem Retinal in 13-*cis* oder 9-*cis*-Konfiguration können Ursprung dieser Diskrepanz sein. Die gute Übereinstimmung beider Spektren legt nahe, dass die Umgebung des Retinals nicht signifikant durch die Komplexierung mit dem Transducers beeinflusst wird.

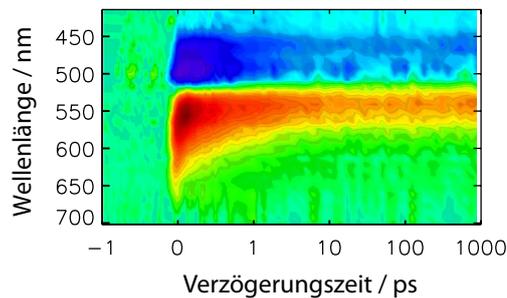


**Abbildung 9.13:** Vergleich der UV-vis-Absorptionsspektren von NpSR II und dem NpSR II-HTr II<sub>1-157</sub>-Komplex. Bis auf den Bereich < 400 nm sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

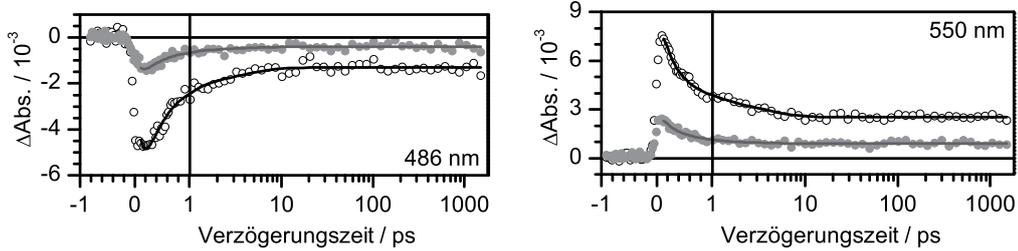
### Transiente Absorptionmessungen am NpSR II-HTr II<sub>1-157</sub>-Komplex

Abbildung 9.14 gibt eine Übersicht über die beobachteten transienten Differenzsignale des NpSR II-HTr II<sub>1-157</sub>-Komplex nach Photoanregung bei 495 nm. Die Differenzsignale sind hierbei farblich kodiert. Blau koloriert sind negative Absorptionsänderungen und in rot sind positive Absorptionsänderungen dargestellt. Grün eingefärbte Bereiche des 2D-Plots enthalten keine signifikanten lichtinduzierten Änderungen. Die x-Achse ist bis 1 ps linear skaliert, hiernach logarithmisch.

Zwischen 450 nm und 510 nm ist die negative Absorptionsänderung des gebleichten Grundzustands erkennbar. Die Bande ist wie auch das cw-Absorptionsspektrum strukturiert. Wie die exemplarisch gewählte transiente Absorptionsänderung bei 486 nm in Abbildung 9.15 zeigt, zerfällt die negative Signatur mit einer Hauptkomponente von < 500 fs und einer nachfolgenden Zeit im ps-Bereich. Hierbei bleibt ein negatives Restsignal übrig. Nach Verzögerungszeiten von 10 ps ist keine weitere Dynamik beobachtbar. Rotverschoben hierzu ist zwischen 520 nm und 660 nm eine positive Differenzbande sichtbar, die mit Anregung gebildet wird. Die rote Flanke weist während der ersten 10 ps eine starke Blauverschiebung auf. Die Hauptdynamik findet wie auch schon bei der Charakteristik des ausgebleichten Grundzustands mit >0,5 ps und 3 ps statt. Eine Beispielstransiente ist in Abbildung 9.15 dargestellt. Am Ende des beobachteten



**Abbildung 9.14:** 2D-Repräsentation der transienten Absorptionsänderungen des NpSR II-HTr II<sub>1-157</sub>-Komplexes nach Anregung bei 495 nm. Die Hauptbeiträge stammen von der Depopulation des Grundzustandes sowie der Absorption des angeregten Zustands, die in die Absorption des Photoprodukts übergeht.



**Abbildung 9.15:** Transiente Absorptionsänderungen des NpSRII-HTrII<sub>1-157</sub>-Komplexes unter paralleler (○) und senkrechter (●) Polarisation von Anreg- und Abtastpuls. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den globalen Fit der Daten. Die gezeigten Transienten bei 486 nm und 550 nm sind exemplarisch für den Bereich des Grundzustandsbleichens und der Absorption des angeregten Zustands gewählt.

Zeitbereichs ist noch ein Restdifferenzsignal vorhanden. Dieses kann mit Sicherheit der Absorption des Photoprodukts zugeordnet werden. Das zu frühen Verzögerungszeiten beobachtete positive Signal entspricht hingegen wahrscheinlich einer Überlagerung aus der Absorption des frühen, wahrscheinlich schwingungsangeregten Photoprodukts sowie der Absorption des angeregten Zustands.

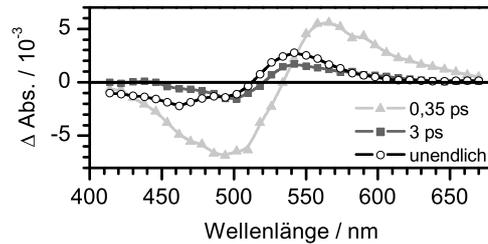
Zur Analyse der Daten wurden diese in einer globalen Fitanalyse mit einer Summe von Exponentialfunktionen angepasst. Der Fit wurde dabei erst ab Verzögerungszeiten > 150 fs durchgeführt, damit unkorrigierte Reste des kohärenten Signals um den Zeitnullpunkt nicht berücksichtigt werden. Es zeigte sich, dass die Daten optimal mit vier Zeitkonstanten angepasst werden. Diese sind in Tabelle 9.4 aufgelistet. Zum Vergleich sind zudem die Ergebnisse von transienten Absorptionsmessungen an unkomplexiertem NpSRII angegeben.

Die erste Zeitkonstante der in dieser Arbeit durchgeführten Messung von 100 fs liegt hierbei im Bereich der Zeitaufösung des Experiments und wird im folgenden daher nicht weiter diskutiert. Sie wird dennoch für eine gute Anpassung benötigt. Die Amplituden der nachfolgenden Zeitkonstanten sind in Abbildung 9.16 dargestellt. Das zerfallassozierte Spektrum der Komponente  $\tau_2$  besitzt die größte Amplitude. Zwischen 410 nm und 540 nm hat das Amplitudenspektrum einen negativen Beitrag. Dieser kann aufgrund der

	$\tau_1$ / ps	$\tau_2$ / ps	$\tau_3$ / ps	$\tau_\infty$
NpSRII - HTr II	<0.15	0,35	3	unendlich
NpSRII (s. Kap. 9.2, S. 177)	0.1	0,35-0.4	3-4	unendlich
NpSRII Lutz et al. [174]	< 0.15	0,4	5	unendlich

**Tabelle 9.4:** Erhaltene Zeitkonstanten der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten des NpSRII-HTrII<sub>1-157</sub>-Komplexes im sichtbaren Spektralbereich. Zum Vergleich sind die erhaltenen Zeitkonstanten von der Messung an NpSRII ohne Transducer angegeben.

spektralen Übereinstimmung mit dem Grundzustandsabsorptionsspektrum der Repopulierung des all-*trans*-Retinal-S<sub>0</sub>-Zustands zugeschrieben werden. Es kann zudem möglich sein, dass die rote Flanke der negativen Signatur der Produktbildung zugeschrieben werden kann. Bei Wellenlängen > 540 nm sind positive Amplituden zu beobachten. Sie sind auf den Rückgang der positiven Absorptionsänderung in diesem Spektralbereich zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass diese Bande zum größten Teil den Zerfall des angeregten Zustands beschreibt. Eine Interpretation in Richtung der Relaxation früher, schwingungsheißer Photoproduktabsorptionen kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

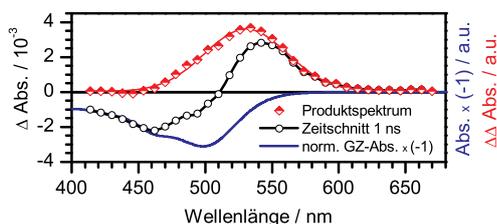


**Abbildung 9.16:** Zerfallasoziierte Spektren der Anpassung der unter paralleler Messanordnung gewonnenen Daten des NpSR II-HTr II<sub>1-157</sub>-Komplexes im sichtbaren Spektralbereich. Die Hauptkomponenten ( $\tau_2$  bis  $\tau_\infty$ ) sind gezeigt.

Das zerfallasoziierte Spektrum von  $\tau_3$  zeigt ähnlich wie die vorhergehende Komponente eine strukturierte negative Bande im blauen Spektralbereich, die bei 520 nm in eine positive Charakteristik übergeht. Die positive Bande erstreckt sich jedoch nur noch bis etwa 600 nm. Sie beschreibt den in den transienten Absorptionsänderungen beobachteten leichten Rückgang der positiven Bande. Da im beobachteten Spektralbereich kein Hinweis auf stimulierte Emission gefunden wurde, kann aus den präsentierten Daten nicht geschlossen werden, ob der beobachtete Rückgang der positiven Bande dem Zerfall des angeregten Zustands oder einer schwingungsangeregter Photoproduktpopulation zugeordnet werden kann. Für NpSR II ohne Transducer konnte in dieser Arbeit (siehe Abbildung 9.6 auf Seite 177) letzteres gezeigt werden. Die auch mit dieser Zeitkonstante beobachtete negative Amplitude zeigt, dass mit diesem Prozess die Repopulierung des Ausgangszustands verknüpft ist. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_\infty$  repräsentiert das Differenzspektrum am Ende des beobachteten Zeitraums. Die strukturierte negative Bande des ausgebleichten Grundzustands sowie die PhotoproduktSignatur sind erkennbar. Das Differenzspektrum weist für das Photoprodukt ein Maximum bei 540 nm auf.

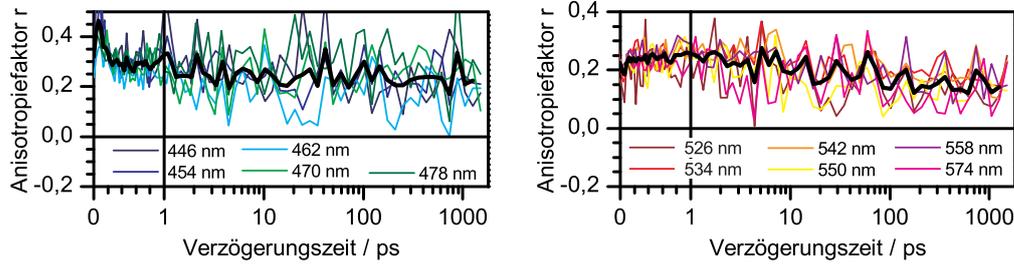
### Auswertung der Polarisationsabhängigkeit

Die Polarisationsabhängigkeit der transienten Absorptionsdaten wird in der Auftragung der Einzeltransienten in Abbildung 9.15 sichtbar. Die Zeitverläufe, die in paralleler Polarisation von Anregungs- und Abtastpuls gemessen wurden, weisen eine wesentlich höhere Amplitude auf als die unter senkrechter Polarisation der Pulse gemessenen. Zur



**Abbildung 9.17:** Durch Subtraktion des ausgebleichten Grundzustandsspektrums (blau) konnte das Absorptionsspektrum des K-Photoprodukts für SRRI-HTrII<sub>1-157</sub> (rote Rhomben) aus dem transienten Spektrum bei 1 ns (schwarz) berechnet werden. Ein Gaußfit (rote durchgezogene Linie) der erhaltenen Bande ergab eine Zentralwellenlänge von 530 nm und eine Halbwertsbreite von 60 nm.

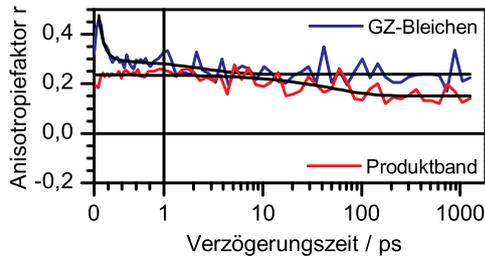
Analyse wurde aus den Rohdaten mit Hilfe von Formel 3.17 (siehe Seite 32) der zeitabhängige Anisotropiefaktor berechnet. Um den beobachteten Anisotropiewerten Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten zuzuordnen ist es unerlässlich zu wissen, in welchen Bereichen des Spektrums überlagerte Banden zu finden sind und welche Teile nur einen Beitrag enthalten. Zu frühen Verzögerungszeiten ist eine Trennung der Banden des Grundzustandsbleichens, der Absorption des angeregten Zustands sowie früher Photoprodukt-Beträge generell schwierig. Da nach 10 ps jedoch keine weitere Dynamik feststellbar ist, sollten die transienten Spektren hier durch die negative Absorptionsänderung des Grundzustands sowie der positiven Bande des relaxierten K-Photoprodukts beschrieben werden. Dies bedeutet, dass durch Subtraktion des negativen Grundzustandsspektrums aus dem transienten Spektrum bei 1 ns das K-Photoproduktspektrum herausgerechnet werden kann. Abbildung 9.17 visualisiert dies. Das erhaltene Spektrum (rote Rhomben) konnte mit einer Gaußfunktion optimal angepasst werden. Es ergab sich eine Zentralwellenlänge von 530 nm und eine Halbwertsbreite von 60 nm. Lässt man die vermutlich sehr breite Absorption des angeregten Zustands außer Acht, so macht dies deutlich, dass der Anisotropieparameter für das Grundzustandsbleichen bei Wellenlängen  $< 450$  nm beobachtet werden kann. Zwischen 450 nm und 530 nm wird hingegen eine Überlagerung aus gebleichtem Grundzustand und Photoprodukt beobachtet. Informationen über den Verlauf der Anisotropie des K-Photoprodukts können entsprechend bei Wellenlängen  $> 530$  nm erlangt werden. Aufgrund des geringen Signals der unter senkrechter Polarisation durchgeführten Messung im Spektralbereich kleiner  $> 450$  nm und dem damit auch geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis, können für diesen Bereich keine verlässlichen Aussagen getroffen werden. Da der Anisotropiefaktor der Theorie nach in diesem Bereich einen konstanten Wert von  $r = 0,4$  aufweisen sollte, geht jedoch keine Information verloren. Abbildung 9.18 (links, blau-grün) stellt ausgewählte transiente Änderungen des Anisotropiefaktors  $r$  im Überlappungsbereich zwischen Grundzustandsbleichens und der Produktabsorptionen zwischen 450 nm und 480 nm dar. Die schwarze, dickere Linie zeigt den gemittelten Verlauf der gezeigten Transienten. Im Bereich von 100 fs ist ein schneller Abfall vom Ausgangswert  $r = 0,4$  festzustellen. Diesem folgt ein weiterer leichter Abfall im Pikosekundenbereich. Der Anisotropiefaktor zeigt danach keine signifikanten Änderungen mehr und verweilt auf einem Wert von  $r = 0,25$ .



**Abbildung 9.18:** Transiente Änderung des Anisotropiefaktors für ausgewählte Transienten im Überlagerungsbereich zwischen Grundzustandsbleichen, der Absorption des angeregten Zustands sowie des Photoprodukts (links) und der Absorption des angeregten Zustands bzw. des Photoprodukts (rechts). In schwarz sind jeweils die gemittelten Anisotropiewerte in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

Für die vom Grundzustandsbleichen ungestörten Zeitverläufe der Absorption des Photoprodukts (Abbildung 9.18 rechts, rot), die zu frühen Zeiten von der Absorption des angeregten Zustands überlagert sind, sind aufgrund des sehr ähnlichen Zeitverlaufs transiente Anisotropieänderungen von 530 nm bis 570 nm gezeigt. Der Zeitverlauf der Anisotropie zeigt zu Anfang keine Dynamik. Bis etwa 10 ps ist ein konstanter Wert von  $r = 0,25$  zu beobachten. Hiernach fällt die Anisotropie auf einen Wert von  $r = 0,15$ .

Zur weiteren Evaluation der zeitabhängigen Anisotropie wurden die gemittelten Werte durch Exponentialzerfälle angepasst. Die zeitliche Änderung im Spektralbereich zwischen 450 nm und 480 nm konnte dabei mit zwei Zeitkonstanten von  $\tau_1 = 80$  fs und  $\tau_2 = 2$  ps angepasst werden. Für den Zeitverlauf der Produktbanden berechnete das Fitprogramm eine Zeitkonstante von  $\tau_1 = 50$  ps.



**Abbildung 9.19:** Anpassung der gemittelten Anisotropieparameter des NpSR<sub>II</sub>-HTr<sub>II</sub><sub>1-157</sub>-Komplexes in den Bereichen zwischen 450 nm und 480 nm (blau) sowie 530 nm bis 570 nm (rot).

Bereich	$\tau$
450 - 480 nm	$80 \pm 30$ fs
450 - 480 nm	$2 \pm 2$ ps
530 - 570 nm	$50 \pm 20$ ps

**Tabelle 9.5:** Ermittelte Zeitkonstanten der exponentiellen Anpassung der gemittelten Anisotropiedaten in den Bereichen zwischen 450 nm und 480 nm sowie zwischen 530 nm und 570 nm.

## Diskussion

Die in dieser Arbeit dargestellten transienten Absorptionsmessungen am NpSRII-HTr-Komplex legen dar, dass der Transducer die Isomerisierung des Retinals nicht beeinflusst. Der Vergleich der erhaltenen Zeitkonstanten und der zerfallassozierten Spektren zeigte eine sehr gute Übereinstimmung. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der S<sub>1</sub>-Deaktivierungsmechanismus des Komplexes dem des puren Rezeptors gleicht. Hiernach folgt einer schnellen Bewegung aus dem Franck-Condon-Bereich ( $\tau_1 < 150$  fs) die monoexponentielle Depopulation des angeregten Zustands mit  $\tau_2 = 0,35$  ps. Die nachfolgende Zeitkomponente von  $\tau_3 = 3$  ps wird einem Kühlprozess im Grundzustand zugeordnet.

Für die dem K-Intermediat folgenden Photozyklus-Produkte zeigte sich in Blitzlicht-photolysemessungen [394], dass auch die Bildungskinetik des M-Intermediats nicht von der Bindung des Transducers beeinflusst wird. Im Gegensatz hierzu wird die Kinetik der nachfolgenden Schritte durch den Transducer beeinflusst. Bei solubilisierten Proben ist der M-Zerfall bzw. die Bildung des O-Intermediats nach Komplexierung des Transducer deutlich langsamer. Zudem ist die transient beobachtete Population des O-Intermediats für den solubilisierten Rezeptor wesentlich größer. Für den Zerfall des O-Intermediats und der damit verbundenen Repopulation des all-*trans*-Retinal-Ausgangszustands wurde sowohl für den SRII-HTr-Komplex aus dem Organismus *Halobacterium salinarum* [395] als auch dem Organismus *Natronomonas pharaonis* eine Beschleunigung festgestellt. Dies zeigt zusammengefasst, dass der Transducer den ersten Teil des Photozyklus inklusive der Isomerisierung des Retinals nicht beeinflusst, aber drastisch in das Gleichgewicht zwischen M- und O-Intermediat eingreift.

Die polarisationsabhängigen Messungen lieferten weitere interessante Einblicke in die Isomerisierungsdynamik. Für den Bereich der Überlagerung zwischen den im 2D-Spektrum leicht erkennbaren Beiträgen der Absorption des angeregten Zustands, des Grundzustandsbleichens sowie des Photoprodukts fiel der Anisotropiefaktor von einem anfänglichen Wert von  $r = 0,4$ , was paralleler Polarisation des Grundzustands und der Produktzustände entspricht, mit einer Zeitkonstanten von etwa 100 fs auf einen Wert von  $r = 0,3$ . Der Anfangswert von  $r = 0,4$  kann dem Beitrag des gebleichten Grundzustands zugeordnet werden. Auch das Übergangsdipolmoment des angeregten Zustands könnte im Franck-Condon-Bereich noch senkrecht zum Grundzustand liegen. Der nachfolgende Verlauf stimmt zeitlich mit der initialen Bewegung des Wellenpakets überein. Dies würde bedeuten, dass der nachfolgend zwischen 0,3 und 0,5 ps gefundene Anisotropiewert von  $r = 0,3$  (entspricht einem Winkel von 24°) einem mittleren Wert aus den Beiträgen des Grundzustandsbleichens, der relaxierten S<sub>1</sub>-Population sowie wahrscheinlich geringen Anteilen an frühem Photoprodukt entspricht. Der gefundene weitere Abfall des zeitlichen Verlaufs der Anisotropie kann mit einer Zeitkonstante von etwa 2 ps angepasst werden. Diese Komponente entspricht dem Wert der Zeitkonstante  $\tau_3$ , die dem Grundzustandskühlprozess zugeordnet wurde. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass die beobachtete Änderung des Anisotropiewerts auch durch diesen Vorgang hervorgerufen wird. Für Verzögerungszeiten  $> 10$  ps wurde ein konstanter Anisotropiefaktor von  $r = 0,25$  berechnet. Dies heißt, dass die Übergangsdipolmomente für das Grundzustandsbleichen

(theoretischer Wert =  $0^\circ$ ) und das Photoprodukt einen mittleren Winkel von  $\theta = 30^\circ$  annehmen.

Für die zeitlichen Änderungen des Anisotropiefaktors  $r$  im Spektralbereich, in dem nur das Photoprodukt und zu kurzen Verzögerungszeiten der angeregte Zustand absorbieren, ist in den ersten 7 ps keine Dynamik feststellbar. Der Anisotropiefaktor kann zu einem mittleren Winkel von  $30^\circ$  berechnet werden. Nachfolgend ist ein Abfall der Anisotropie auf einen Wert von  $r = 0,15$  zu beobachten, der einem mittleren Winkel von  $40,2^\circ$  entspricht. Die Anpassung des zeitlichen Verlaufs mit einer Exponentialfunktion ergab eine Zeitkonstante von 50 ps. Eine solche Zeitkonstante konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten globalen Fitanalysen des NpSR<sub>II</sub>-HTr<sub>1-157</sub>-Komplex sowie des isolierten Rezeptors nicht beobachtet werden. Ingo Lutz passte aber in seiner Dissertation [396] die Primärdynamik von NpSR<sub>II</sub> neben den oben vorgestellten Komponenten mit einer weiteren Zeitkonstanten von 53 ps an. Diese ordnete er einem Grundzustandskühlprozess zu. Dieser ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit den auf einer 10 ps Zeitskala auftretenden Änderungen des Peptidrückgrats [397, 398] verknüpft. Analog zu dieser Interpretation kann auch die im Bereich des Photoprodukts gefundene Dynamik der Anisotropie begründet werden.

In der Literatur sind nur sehr wenige Anisotropiemessungen an Retinalproteinen bekannt. Für BR wurde in Fluoreszenzmessungen abhängig von der Wellenlänge ein Anisotropiefaktor von  $r = 0,25-0,35$  gefunden [171]. Dynamische Effekte waren dabei während der ersten 2 ps nicht zu erkennen. Bei transienten Absorptionsmessungen an Rhodopsin beobachtete man bei einer Abtastwellenlänge von 580 nm, die der Absorption des Batho-Produkts entspricht, den Anstieg der Anisotropie von einem Wert von  $r = 0,25$  bei  $t=0$  auf einen Wert von  $r = 0,34$  bei Verzögerungszeiten  $> 600$  fs [399]. Für NpSR<sub>II</sub> ohne Transducer ist lediglich die zeitliche Änderung des Anisotropiefaktors  $r$  für eine Wellenlänge von 556 nm zwischen 0 und 100 ps beschrieben [396]. Dieser zeigt eine leicht abfallende Dynamik im Bereich der ersten paar Pikosekunden und hat hiernach einen Wert von  $r = 0,35$ . Der in dieser Arbeit beobachtete Wert für den NpSR<sub>II</sub>-Transducer<sub>1-157</sub>-Komplex weicht signifikant von diesem Wert ab. Dies kann auf durch die Transducer-Bindung hervorgerufene strukturelle Unterschiede hinweisen. Andererseits unterliegt wie bereits in der experimentellen Durchführung beschrieben das Weißlicht in den nacheinander durchgeführten Messung der transienten Absorptionsänderungen in paralleler und senkrechter Polarisation wahrscheinlich kleinen Schwankungen, sodass die Absolutwerte des Anisotropiefaktors durchaus mit einem nicht zu vernachlässigbaren Fehler behaftet sind. Die dynamischen Beobachtungen sollten dadurch aber nur gering beeinflusst sein. Letztendlich wird eine weitere Messung der Proben notwendig sein um deren Richtigkeit zu validieren.

## 9.4 Resümee

Im vorliegenden Kapitel wurde der Einfluss von Azid auf die Isomerisierungsdynamik der archaealen Retinalproteine NpSR<sub>II</sub> wt, BR wt und die BR D85N-Mutante sowie die Auswirkung der Transducerbindung auf NpSR<sub>II</sub> untersucht. Die erste Studie wurde dabei dadurch motiviert, dass Azid einen signifikanten Einfluss auf die Primärdynamik der Protonenakzeptormutante NpSR<sub>II</sub>-D75N hat [330]. Die Isomerisierung wird nach Zugabe von Azid fast auf Wildtyp-Protein-Ausmaße beschleunigt. Zudem wird ein zusätzlicher Photoprodukt-Übergang im Beobachtungszeitraum sichtbar, der einem K<sub>1</sub>-K<sub>2</sub>-Übergang zugeschrieben wurde. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen konnten aber eindeutig zeigen, dass der Einfluss von Azid eine besondere Charakteristik der sub-Nanosekundendynamik von NpSR<sub>II</sub>-D75N ist. Die durchgeführten Kontrollmessungen am Wildtyp-Protein NpSR<sub>II</sub>, sowie an dem verwandten BR und der analogen D85N-Mutante waren absolut unbeeinflusst von der Zugabe von Azid.

Im zweiten Schritt wurde der NpSR<sub>II</sub>-HTr<sub>1-157</sub>-Komplex mittels polarisationsabhängiger transientser Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich untersucht. Obwohl das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in der unmittelbaren Nähe des Retinals durch die Anwesenheit des Transducers deutlich beeinflusst wird [356], ist die Primärdynamik des Rezeptors mit und ohne Transducer identisch. Die Berechnung des zeitabhängigen Anisotropiefaktors  $r$  aus den transienten Messungen unter paralleler und senkrechter Polarisation von Anregungs- und Abtastungspuls ermöglichten zudem gemittelte Winkel für die Übergangsdipolmomente der beobachteten Populationen zu bestimmen. Es war aber lediglich im Bereich zwischen 530 nm und 570 nm zu langen Verzögerungszeiten möglich selektive Einblicke in das Übergangsdipolmoment eines Zustands zu bekommen. Der mittlere Winkel zwischen dem Dipolmoment des Grundzustands und dem des K-Photoprodukts konnte zu 40,2° bestimmt werden.

Trotz der spektralen Überlagerungen zeigt der Anisotropiefaktor eindeutige zeitliche Abhängigkeiten. Zwischen 450 nm und 480 nm konnte eine 100 fs Komponente gefunden werden, die zeitlich der Bewegung aus dem Franck-Condon-Bereich entspricht. Auch die hiernach beobachtete 2 ps-Komponente spiegelt den Verlauf der transienten Absorptionsdaten wieder. Ein Zusammenhang mit dem zugeordneten Grundzustandskühlprozess ist daher wahrscheinlich. Im Bereich des K-Photoprodukts weist der transiente Verlauf der Anisotropie zudem eine 50 ps-Dynamik auf. Eine dynamische Entwicklung in diesem Zeitbereich wurde auch von Lutz et al. [396] bei der Messung des Transducer-freien Rezeptors entdeckt und dort einem Kühlprozess zugeordnet, der wahrscheinlich mit konformationellen Proteinänderungen in Verbindung gebracht werden kann [397, 398]. Die hier gefundene Anisotropieänderung könnte daher ähnlichen Ursprungs sein.

# 10 Zusammenfassung

## 10.1 Deutsche Fassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Dynamik des Retinalchromophors in archaealen, bakteriellen sowie eukaryotischen Retinalproteinen zeitaufgelöst zu untersuchen und so Informationen über die unterschiedlichen lichtgesteuerten zyklischen Reaktionen zu erhalten. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Studie der Isomerisierung des Retinals, die je nach System in einem Zeitbereich von wenigen hundert Femtosekunden bis hin zu einigen zehn Pikosekunden abläuft. Die Anreg- / Abtast-Spektroskopie ist hierbei die Methode der Wahl, da sie die Auflösung der Reaktionsdynamik im Bereich von 100 fs erlaubt. Hierdurch wird im Falle der Retinalproteine die Bildung des ersten Grundzustandsintermediats K beobachtbar. Darüber hinaus wurde die nachfolgende langsamere Reaktionsdynamik (bezogen auf die Bakteriorhodopsin (BR)-Terminologie werden die weiteren Zustände als L-, M-, N- und O-Intermediate bezeichnet) mit Hilfe von Laserblitzlichtphotolyseexperimenten im sichtbaren Spektralbereich sowie Tieftemperaturmessungen im Sichtbaren sowie im Infraroten charakterisiert. Einige wichtige Einsichten konnten hierdurch erlangt werden, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Für das bakterielle Proteorhodopsin (PR) wurde die Primärdynamik im sichtbaren Spektralbereich unter  $D_2O$ -Bedingungen bei pD-Werten untersucht, bei denen der primäre Protonenakzeptor Asp-97 entweder deprotoniert (pD 9,2) oder protoniert (pD 6,4) vorliegt. Es zeigte sich, dass das isomerisierte K-Photoprodukt mit zwei Zeitkonstanten im Bereich von 1 ps und 20 ps gebildet wird. Der biexponentielle Zerfall des angeregten Zustands war dabei weit weniger vom Ladungszustand des primären Protonenakzeptors abhängig als dies für die in der Literatur beschriebenen Messungen in  $H_2O$  der Fall ist. Der Vergleich mit jenen Messungen erlaubte es den kinetischen Isotopeneffekt für die Deaktivierung des  $S_1$ -Zustandes zu berechnen. Die Ergebnisse weisen dabei auf ein deutlich unterschiedliches Wasserstoffbrückenmuster unter sauren und alkalischen Bedingungen hin. Um diesem Resultat weiter nachzugehen, wurde die D97N-Mutante untersucht, bei der die Mutation des primären Protonenakzeptors dazu führt, dass die Seitenkette im untersuchten pH-Bereich nicht protonierbar bzw. deprotonierbar ist. Die Mutante dient daher als Modellsystem für den Wildtyp unter sauren Bedingungen. Die gefundene Primärdynamik von PR D97N läuft nur unwesentlich langsamer ab als die des Wildtyp-Proteins bei pD 6,4. Auch der berechnete kinetische Isotopeneffekt liegt im Bereich für PR wt bei pD / pH 6 und deutlich unterhalb des berechneten Werts für alkalische Bedingungen. Man kann daher davon ausgehen, dass das Wasserstoffbrückenmuster in der D97N-Mutante große Ähnlichkeiten mit dem des Wildtyp-Proteins bei

sauren pH-Werten besitzt. Um weitergehende Einsichten in die Primärdynamik von PR zu erlangen, wurden am Wildtyp-Protein bei pD 6,4 und pD 9,2 sowie der D97N-Mutante transiente Absorptionmessungen im Bereich der C=C- und C=N-Schwingung des Retinalchromophors durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die beobachtete Dynamik keine Einblicke in die Isomerisierung zulässt, sondern hauptsächlich die Änderung der molekularen Temperatur widerspiegelt. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die Quantenausbeute der K-Bildung unabhängig vom pD-Wert ist. In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss des hochkonservierten His-75 auf die Isomerisierungsdynamik untersucht. Hierfür wurden zwei Mutanten verwendet, bei denen das Histidin zum einen gegen ein ungeladenes Asparagin (H75N), zum anderen durch ein Methionin, der Aminosäure an der homologen Position von BR, ersetzt wurde (H75M). Die Erniedrigung des  $pK_a$ -Werts des primären Protonenakzeptors in den Mutanten weist auf die stabilisierende Wirkung des Histidins hin, jedoch lassen die Kurzzeitmessungen keinen ausgeprägten Einfluss der Mutationen auf die Isomerisierungsdynamik erkennen. Dies bedeutet, dass die elektrostatischen und sterischen Eigenschaften wie auch das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk in der direkten Nachbarschaft des Retinals in den Mutanten erhalten sind. Neben den Untersuchungen der Primärdynamik war auch der nachfolgende Teil des Photozyklus im Blickpunkt dieser Arbeit. Die Tieftemperaturstudien im sichtbaren Spektralbereich zeigten dabei, dass die dem K-Zustand folgenden Intermediate oberhalb von 180 K beobachtet werden können. Weiterhin erlaubte dieser Ansatz das in kinetischen Messungen nicht beobachtete M-Intermediat des sauren Photozyklus nachzuweisen. Dieses sehr wichtige Resultat validierte die pH-abhängige Umkehr der Pumprichtung und lieferte somit einen wichtigen Beitrag zum molekularen Verständnis der Protonenpumpe PR. Um strukturelle Einblicke in den Photozyklus zu erlangen und die am Pumpvorgang beteiligten Aminosäuren zu identifizieren wurden nachfolgend Tieftemperaturuntersuchungen im infraroten Spektralbereich bei mehreren pH-Werten durchgeführt. Die Implementierung eines sichtbaren Faserspektrometers in den Strahlengang des FTIR-Aufbaus erlaubte hierbei die simultane Aufnahme der lichtinduzierten Änderungen der Bandenposition im sichtbaren Spektralbereich und der Änderungen der Proteinstruktur sowie der Protonierungszustände der Seitenketten. Für den M-Zustand bei pH 5,1 konnte hierbei gezeigt werden, dass auch hier eine Aspartat- oder Glutamat-Seitenkette als Protonenakzeptor fungiert. Die Bandenposition favorisiert dabei eine Zuordnung zu Glu-108, das unter alkalischen Bedingungen der Protonendonator ist. Weiterhin konnte dargelegt werden, dass der Photozyklus von PR nicht nur vom  $pK_a$ -Wert des Protonenakzeptors Asp-97 abhängt, sondern von einem Zusammenspiel mehrerer pH-abhängiger Gleichgewichte, da schon kleinste Änderungen des pH-Werts im Bereich des  $pK_a$  großen Einfluss auf die beobachteten Differenzspektren sowie die Dynamik haben. Auf der Basis der publizierten elektrophysiologischen Messungen wurde dies in Form eines Drei-Zustands-Modells interpretiert. Bei pH-Werten  $> 9,0$  wird eine nach außen gerichtete Protonenpumpaktivität beobachtet, bei pH-Werten  $< 5,1$  hingegen eine nach innen gerichtete. Zwischen diesen pH-Werten wird kein gerichteter Protonentransport vorgeschlagen.

Auch für das in jüngster Vergangenheit zur optogenetischen Kontrolle neuronaler Netze eingesetzte eukaryotische Retinalprotein Channelrhodopsin-2 (ChR-2) wurden umfangrei-

che Photozyklusstudien durchgeführt. Mit Hilfe von transients Absorptionsspektroskopie im Sichtbaren sowie der Fluoreszenzaufwärtskonvertierung konnte gezeigt werden, dass der angeregte Zustand nach einem Relaxationsprozess im Bereich von 150 fs bei pH 7 monoexponentiell mit 0,4 ps zerfällt. Die Reaktion setzt sich mit einem Kühlprozess (2,7 ps) und kleineren Änderungen der Linienbreite des K-Photoprodukts (200 ps) fort. Die hohe Übereinstimmung dieser Dynamik mit den bekannten Merkmalen der Primärreaktion von BR und Sensorrhodopsin II (SRII) legt nahe, dass die elektrostatischen Bedingungen sowie das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk dieser Proteine sehr ähnlich sind. Die Isomerisierungsdynamik von ChR-2 sollte daher mit den etablierten BR-Modellen interpretiert werden können. Durch die schnelle Deaktivierung des angeregten Zustands war es zudem möglich in Kurzzeitmessungen im infraroten Spektralbereich die direkten Auswirkungen der Retinalisomerisierung auf die Proteinumgebung zu beobachten. Die Vielzahl ausgeprägter Differenzbanden zeigte hierbei, dass neben der schnellen Isomerisierung auch der Energietransfer der im Retinal gespeicherten Überschussenergie an das Protein sehr effizient ist. Über Blitzlichtphotolyseexperimente konnte die Langzeitdynamik des ChR-2-Photozyklus erstmals mit einer sub- $\mu$ s Zeitauflösung charakterisiert werden. Neben der für Retinalproteine typischen Abfolge von blau- und rot-verschobenen Intermediaten, ist der Photozyklus mit einer Dauer von etwa 5 s signifikant langsamer als der gemeinhin schon langsame der sensorischen Retinalproteine. Auch die beobachtete triexponentielle Grundzustandsrückkehrkinetik ist eher ungewöhnlich für ein Retinalprotein. Um die Aktivierungsbarrieren des ChR-2-Photozyklus zu untersuchen, wurden temperaturabhängige Messungen durchgeführt. Diese ergaben, dass der Photozyklus durch entropische Faktoren bestimmt wird. Die am Ende des Photozyklus stark negativen Aktivierungsentropien können als Wiederherstellung der geordneten geschlossenen Konfiguration des Kanals angesehen werden. Die Temperaturunabhängigkeit der letzten Zeitkonstanten konnte mit einer rauen Potentialhyperfläche erklärt werden, bei der die Energiebarrieren unterhalb  $k_B T$  liegen. Da FTIR-Messungen zeigen konnten, dass dieser Prozess mit lokalen, strukturellen Änderungen der Retinalbindetasche zusammen hängt, ist die Annahme einer Reihe sequentieller Schritte, in denen die ursprüngliche Struktur inklusive der Wasserstoffbrücken wieder hergestellt wird, wahrscheinlich. In einem letzten Ansatzpunkt wurde die Imidazol-Abhängigkeit der Langzeitdynamik des ChR-2-Photozyklus untersucht. Es zeigte sich, dass die Dynamik um die De- und Reprotonierung stark von diesem externen Donor beeinflusst wird. Es wurde jedoch nicht nur eine Beschleunigung der Reprotonierungsreaktion beobachtet, sondern auch der molekulare Mechanismus scheint sich nach Zugabe von Imidazol geändert zu haben. Diese Effekte können am ehesten durch eine Verstärkung des Histidin-Donor-Effekts durch das strukturell verwandte Imidazol erklärt werden.

Genau dieser Einfluss externer Donor-Moleküle stand ebenfalls in einer Kurzzeit-Studie archaer Retinalproteine im Fokus. Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass die Zugabe von Azid-Anionen die Isomerisierungsdynamik sowie einen nachfolgenden spektral stillen Übergang der Protonenakzeptormutante SRII D75N beeinflusst. Die vorliegende Arbeit stellte heraus, dass dieser Effekt ein einzigartiges Merkmal dieser Mutante ist, da die Zugabe von Azid keine Auswirkungen auf die Primärdynamik von

SRII, BR sowie die analoge BR D85N-Mutante ergab. Abschließend wurde überdies die Bedeutung des in der Zelle in 2:2-Stöchiometrie beobachteten Transducerkomplexes auf die Primärreaktion von SRII untersucht. Es zeigte sich, dass dieser trotz direkter Wasserstoffverbrückungen keinen Einfluss auf die Isomerisierungsdynamik aufweist, was eine wichtige Information bezüglich der Signalweitergabe sensorischer Retinalproteine ist.

## 10.2 English version

The aim of this PhD thesis was to gain information on the photocycle properties of archaeal, bacterial and eukaryotic retinal proteins by means of time-resolved spectroscopy in the visible and the infrared. The work focuses on the ultrafast isomerization of the retinal chromophore which takes place on a 100 fs to 10 ps time scale depending on the system. The pump-probe-technique allows the investigation of the first two nanoseconds of the photocycle with femtosecond time resolution, thus the formation of the first ground state intermediate, termed the K state, is observable. The subsequent reaction steps of the photocycle (according to the bacteriorhodopsin (BR) terminology the emerging intermediates are named L, M, N and O) were investigated using laser flash photolysis as well as low temperature spectroscopy. Several important insights are achieved, which are briefly summarized in the following paragraphs.

For the bacterial proton pump proteorhodopsin (PR) pump-probe-measurements in the visible were performed under  $D_2O$  conditions at pD-values where the side chain of the proton acceptor Asp-97 is either deprotonated or protonated. The K photoproduct is formed with two time constants in the range of  $\approx 1$  ps and  $\approx 20$  ps. The biphasic excited state deactivation pathway was found to be less dependent on the pD value than on the pH value illustrating noticeable differences in the hydrogen bonding network under both pH-conditions. This was further validated by the investigation of the D97N mutant which serves as a model system for PR with protonated Asp-97. The obtained isomerization dynamics closely resembles the one under acidic conditions. Also the kinetic isotope effect is in the range as for PR at pD 6.4 and therefore significantly lower as for alkaline PR. To get direct structural insights into the isomerization dynamics ultrafast infrared spectroscopy was performed in the region of the C=C- and C=N-stretching vibration of the chromophore. It turned out that the observed infrared characteristics are mainly dominated by the molecular temperature of the system. Nevertheless, it could be shown that the quantum yield of the K intermediate formation is independent of the pD-value. In a further step the influence of the highly conserved histidine residue on the isomerization properties was investigated. For this purpose two mutants were studied. In the first mutant the histidine is replaced by an uncharged asparagine (H75N) and in the second by a methionine (H75M), the homologous residue in BR. The observed reduction of the  $pK_a$ -value of Asp-97 in the mutants shows the stabilizing effect of the histidine side chain. However, the primary dynamics is only slightly affected by the mutations. This means that the electrostatic and steric properties as well as the H-bonding network in the vicinity

of the retinal Schiff base are not drastically perturbed by the mutation. The subsequent photocycle dynamics was studied by low-temperature spectroscopy. The investigations in the visible spectral range revealed that the photocycle intermediates following the K state can be monitored above 180 K. Furthermore, this cryo-trapping approach allowed the observation of the kinetically silent M intermediate at low pH which is essential for the pumping mechanism. It thus validates the proposed pH-dependent inversion of the pumping direction. To get structural insights into the photocycle reaction and to identify the participating amino acids in the proton translocation pathway low-temperature infrared measurements were performed. The implementation of a fiber spectrometer in the beam path of the FTIR-spectrometer allows the direct comparison of the light induced changes of the visible band position of the chromophore and the alterations in the protein structure as well as side chain protonation changes. At acidic pH it could be shown that another aspartate or glutamate side chain replaces the function of the now protonated Asp-97 as proton acceptor. The band position favors the assignment of Glu-108, which is the proton donor under alkaline conditions. This is in line with the proposed inversion of the pumping direction. Furthermore it could be shown that the photocycle is not only determined by the  $pK_a$ -value of Asp-97, but an interplay of several pH-dependent equilibria, since small pH-changes around the  $pK_a$  have a high impact on the observed difference bands and their dynamics. On the basis of electrophysiological measurements this was interpreted as three state pumping model, in which outward directed pumping is observed at pH-values  $> 9.0$  and inward directed at pH-values  $< 5.1$ . No directed transport is proposed in between these pH-values.

Also for the ion channel channelrhodopsin-2 (ChR-2) comprehensive investigations on the photocycle properties were performed. Ultrafast visible absorption and fluorescence spectroscopy reveals that after a relaxation on the  $S_1$  surface within 150 fs the excited state decays monoexponentially with 400 fs, thereby populating the K-photoproduct. The reaction closes with cooling processes (2.7 ps) and slight alterations in the line width of the K-state (200 ps). The high resemblance to the dynamics of the archaeal retinal proteins BR and sensory rhodopsin II (SRII) implies that the electrostatic conditions as well as the hydrogen bonding characteristics are very similar for all of these proteins. The primary dynamics should therefore be interpreted within the framework of the well-established BR models. Due to the fast  $S_1$ -depopulation it was possible to observe the direct effects of the retinal isomerization on the surrounding protein by pump-probe-spectroscopy in the mid-infrared. A multitude of difference bands is observed. This shows that the excess energy transfer from the retinal to the protein is very efficient. The subsequent photocycle dynamics of ChR-2 was determined by laser flash photolysis. It turned out that the photocycle exhibits the typical BR-like blue and red shifted photointermediates, but is with a turn over rate of  $0,2\text{s}^{-1}$  significantly longer than the photocycles of the usually slow sensory proteins. Also the observed triexponential recovery dynamics of the initial ground state are very unusual for a retinal protein. To learn about the activation energies of the photocycle temperature dependent measurements were performed. It could be shown that the photocycle is mostly determined by entropic factors. The strongly negative activation entropies at the end of the reaction cycle can be assigned

to the restoration of the ordered, closed configuration of the channel. The temperature independence of the last time constant of  $\approx 5$  s was interpreted in terms of a rough potential energy surface with barriers beneath  $k_B T$ . FTIR-spectroscopy showed that the processes on this long time scale are linked to local structural changes in the retinal binding pocket, thus the assignment to a series of sequential steps is likely, which are necessary for the recovery of the initial structure, e.g. the H-bonding network. In a last step the influence of imidazole on the long time photocycle dynamics was investigated. It could be shown that imidazole has a strong impact on the de- and reprotonation dynamics of the retinal Schiff base linkage to the protein. Not only an acceleration of the reprotonation dynamics was found, but also a change in the molecular mechanism. An enhancement of the histidine donor moiety by the structurally related imidazole is assumed.

The influence of another external donor on the isomerization properties of archaeal retinal proteins was in the focus of a further ultrafast study. Previous measurements could show that the addition of azide accelerates both the isomerization dynamics and a subsequent spectrally silent transition of the proton acceptor mutant of SRII (D75N). This effect was now proven to be a unique feature of the D75N mutant of SRII, since it was not identified in wild-type SRII, BR and the respective BR mutant D85N. The influence of the cognate transducer complex of SRII on the ultrafast isomerization dynamics of the receptor was investigated in a last transient absorption study. No influence on the primary dynamics could be detected, although the transducer is directly hydrogen bonded to the sensory protein in the proximity of the retinal. This means that the signal transduction does not occur on this early stage of the photocycle.

## Eigene Publikationen

1. Staudt, H., Köhler, T., Lorenz, L., Neumann, K., Verhoefen, M.-K. and Wachtveitl, J. *Time-resolved spectroscopy on Pigment Yellow 101 in solid state* Chem. Phys. (2008), **347**: 462-471.
2. Neumann, K., Verhoefen, M.-K., Weber, I., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Initial reaction dynamics of proteorhodopsin observed by femtosecond infrared and visible spectroscopy*. Biophys. J. (2008), **94**: 4796-4807.
3. Verhoefen, M.-K., Neumann, K., Weber, I., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Primary reaction dynamics of proteorhodopsin mutant D97N observed by femtosecond infrared and visible spectroscopy*. Photochem. Photobiol. (2009), **85**: 540-546.
4. Schäfer, G., Shastri S., Verhoefen, M.-K., Vogel, V., Glaubitz, C., Wachtveitl, J. and Mäntele, W., *Characterizing structure and photocycle of PR 2D crystals with CD and FTIR-spectroscopy* Photochem. Photobiol. (2009), **85**: 529-534.
5. Lörinczi, E., Verhoefen, M.-K., Wachtveitl, J., Woerner, A.C., Glaubitz, C., Engelhard, M., Bamberg, E. and Friedrich, T. *Voltage- and pH-dependent changes in vectoriality of photocurrents mediated by wild-type and mutant proteorhodopsins upon expression in xenopus oocytes*. JMB (2009), **393**: 320-341.
6. Verhoefen, M.-K., Lenz, M.O., Amarie, S., Klare, J.P., Tittor, J., Oesterheld, D., Engelhard, M. and Wachtveitl, J. *Primary reaction dynamics of sensory rhodopsin II mutant D75N and the influence of azide*. Biochemistry (2009), **48**: 9677-9683.
7. Verhoefen, M.-K., Bamann, C., Blöcher, R., Förster, U., Bamberg, E. and Wachtveitl, J., *The photocycle of channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps.*, Chem Phys Chem (2010), **11**: 3113-3122.
8. Fiedler, S.-A., Hempelmann, F., Hölper, S., Köhler, T., Pflieger, N., Verhoefen, M.-K., Wörner, A., Bamberg, E., Wachtveitl, J. und Glaubitz, C., *Elucidation of the role of highly conserved residue His-75 in green proteorhodopsin by solid-state NMR, ultra-fast optical spectroscopy and BLM measurements*, (2010), Manuskript in Vorbereitung.
9. Verhoefen, M.-K., Schäfer, G., Shastri, S., Weber, I., Glaubitz, C., Mäntele, W. und Wachtveitl, J., *Low temperature FTIR spectroscopy reveals new insights on the pH-dependent proton pathway of proteorhodopsin.*, (2010), Manuskript in Vorbereitung.



# Literaturverzeichnis

- [1] Palczewski, K. *G protein-coupled receptor rhodopsin*. *Annu. Rev. Biochem.* (2006) **75**: 743–767
- [2] Shichida, Y. und Morizumi, T. *Mechanism of G-protein activation by rhodopsin*. *Photochem. Photobiol.* (2007) **83**: 70–75
- [3] Ridge, K.D. und Palczewski, K. *Visual rhodopsin sees the light: structure and mechanism of G protein signaling*. *J. Biol. Chem.* (2007) **282**: 9297–9301
- [4] Ridge, K.D., Abdulaev, N.G., Sousa, M. und Palczewski, K. *Phototransduction: crystal clear*. *Trends Biochem. Sci.* (2003) **28**: 479–487
- [5] Ritter, E., Elgeti, M. und Bartl, F.J. *Activity switches of rhodopsin*. *Photochem. Photobiol.* (2008) **84**: 911–920
- [6] Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.W., Park, J.H., Heck, M. und Ernst, O.P. *A G-protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model*. *Trends Biochem. Sci.* (2009) **34**: 540–552
- [7] Spudich, J.L., Yang, C.S., Jung, K.H. und Spudich, E.N. *Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2000) **16**: 365–392
- [8] Okamoto, O.K. und Hastings, J.W. *Novel Dinoflagellate clock-related genes identified through microarray analysis* *J. Phycol.* (2003) **39**: 519–526
- [9] Jung, K.H. und Spudich, J.L. *Microbial rhodopsins: Transport and sensory proteins throughout the three domains of life* in *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology* (Horspool, W. M., and Lenci, F., 2004)
- [10] Foster, K.W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. und Nakanishi, K. *A Rhodopsin Is the Functional Photoreceptor for Phototaxis in the Unicellular Eukaryote Chlamydomonas* *Nature* (1984) **311**: 756–759
- [11] Sineshchekov, O.A., Jung, K.H. und Spudich, J.L. *Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in Chlamydomonas reinhardtii* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002) **99**: 8689–8694
- [12] Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. und Deisseroth, K. *Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity* *Nat. Neurosci.* (2005) **8**: 1263–1268

- [13] Zhang, F., Prigge, M., Beyriere, F., Tsunoda, S.P., Mattis, J., Yizhar, O., Hegemann, P. und Deisseroth, K. *Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri** Nat. Neurosci. (2008) **11**: 631–633
- [14] Zhang, F., Wang, L.P., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A. und Deisseroth, K. *Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry* Nature (2007) **446**: 633–637
- [15] Kramer, R.H., Fortin, D.L. und Trauner, D. *New photochemical tools for controlling neuronal activity.* Curr. Opin. Neurobiol. (2009) **19**: 544–552
- [16] Oesterhelt, D. *The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea* Curr. Opin. Struct. Biol. (1998) **8**: 489–500
- [17] Ihara, K., Umemura, T., Katagiri, I., Kitajima-Ihara, T., Sugiyama, Y., Kimura, Y. und Mukohata, Y. *Evolution of the archaeal rhodopsins: Evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation* J. Mol. Biol. (1999) **285**: 163–174
- [18] Dennis, P.P. und Shimmin, L.C. *Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. (1997) **61**: 90–104
- [19] Zimmermann, P. und Pfeifer, F. *Salzliebende Mikroorganismen: Leben am Rande der Löslichkeit von Kochsalz* Biol. unserer Zeit (2004) **34**: 80–87
- [20] Oesterhelt, D., Hartmann, R. und Wagner, G. *Light-Driven Proton Translocation And Energy-Conservation In Halobacteria* Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie (1978) **359**: 453–454
- [21] Lanyi, J.K. *Bacteriorhodopsin.* Annu. Rev. Physiol. (2004) **66**: 665–688
- [22] Scharf, B., Pevec, B., Hess, B. und Engelhard, M. *Biochemical and photochemical properties of the photophobic receptors from *Halobacterium halobium* and *Natronobacterium pharaonis*.* Eur. J. Biochem. (1992) **206**: 359–366
- [23] Scharf, B. und Wolff, E.K. *Phototactic behaviour of the archaeobacterial *Natronobacterium pharaonis** FEBS Lett. (1994) **340**: 114–116
- [24] Lanyi, J.K. *Halorhodopsin - A 2nd Retinal-Pigment In *Halobacterium-Halobium** Trends Biochem. Sci. (1981) **6**: 60–62
- [25] Bamberg, E., Tittor, J. und Oesterhelt, D. *Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1993) **90**: 639–643
- [26] Kolbe, M., Besir, H., Essen, L.O. und Oesterhelt, D. *Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 angstrom resolution* Science (2000) **288**: 1390–1396

- [27] Beja, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich, S., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.N. und DeLong, E.F. *Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea* Science (2000) **289**: 1902–1906
- [28] Beja, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M. und DeLong, E.F. *Proteorhodopsin phototrophy in the ocean* Nature (2001) **411**: 786–789
- [29] Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D.Y., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H. und Smith, H.O. *Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea* Science (2004) **304**: 66–74
- [30] Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M. und Bamberg, E. *Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality* J. Mol. Biol. (2002) **321**: 821–838
- [31] Lörinczi, E., Verhoefen, M.K., Wachtveitl, J., Woerner, A., Glaubitz, C., Engelhard, M., Bamberg, E. und Friedrich, T. *Voltage- and pH-dependent changes in vectoriality of photocurrents mediated by wild-type and mutant proteorhodopsins upon expression in xenopus* J. Mol. Biol. (2009) **393**: 320–341
- [32] Jung, K.H., Trivedi, V.D. und Spudich, J.L. *Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria* Mol. Microbiol. (2003) **47**: 1513–1522
- [33] Vogeley, L., Sineshchekov, O.A., Trivedi, V.D., Sasaki, J., Spudich, J.L. und Luecke, H. *Anabaena sensory rhodopsin: a photochromic color sensor at 2.0 Å* Science (2004) **306**: 1390–1393
- [34] Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. und Lanyi, J.K. *Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 angstrom resolution* J. Mol. Biol. (1999) **291**: 899–911
- [35] Royant, A., Nollert, P., Edman, K., Neutze, R., Landau, E.M., Pebay-Peyroula, E. und Navarro, J. *X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-angstrom resolution* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2001) **98**: 10131–10136
- [36] Kouyama, T., Kanada, S., Takeguchi, Y., Narusawa, A., Murakami, M. und Ihara, K. *Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from Natronomonas pharaonis*. J. Mol. Biol. (2010) **396**: 564–579
- [37] Morris, M.B., Dastmalchi, S. und Church, W.B. *Rhodopsin: structure, signal transduction and oligomerisation*. Int. J. Biochem. Cell Biol. (2009) **41**: 721–724
- [38] Ekspong, G. (Hg.) *Nobel Lectures in Physics 1963-1970* (World Scientific Pub Co, 1971)

- [39] Lundqvist, S. (Hg.) *Nobel Lectures in Chemistry 1963-1970* (Elsevier Publishing Company, 1972)
- [40] Ekspong, G. (Hg.) *Nobel Lectures in Physics 1981-1990* (World Scientific Pub Co, 1991)
- [41] Grenthe, I. (Hg.) *Nobel Lectures in Chemistry 1996-2000* (World Scientific Publishing Co, 2003)
- [42] Ekspong, G. (Hg.) *Nobel Lectures in Physics 2001-2005* (World Scientific Pub Co, 2008)
- [43] Hampp, N. *Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories* Chem. Rev. (2000) **100**: 1755–1776
- [44] Atkins, P.W. *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie* (Wiley-VCH, 2002)
- [45] Atkins, P.W. *Physikalische Chemie* (Wiley-VCH, 2001)
- [46] Banwell, C.N. und McCash, E.M. *Molekülspektroskopie: Ein Grundkurs* (Oldenbourg Verlag, 1999)
- [47] Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 5. überarbeitete Auflage* (Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1995)
- [48] Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 3., durchgesehene Auflage* (VCH Verlagsgesellschaft, 1987)
- [49] Barth, A. und Zscherp, C. *What vibrations tell us about proteins.* Q. Rev. Biophys. (2002) **35**: 369–430
- [50] Krimm, S. und Bandekar, J. *Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins.* Adv. Protein Chem. (1986) **38**: 181–364
- [51] Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. und Ruyschaert, J.M. *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures.* Subcell. Biochem. (1994) **23**: 405–450
- [52] Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. und Ruyschaert, J.M. *Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films.* Eur. J. Biochem. (1990) **193**: 409–420
- [53] Barth, A. *Infrared spectroscopy of proteins.* Biochim. Biophys. Acta (2007) **1767**: 1073–1101
- [54] Demtröder, W. *Laserspektroskopie : Grundlagen und Techniken, 5., erweiterte und neubearbeitete Auflage* (Springer Verlag, 2007)

- 
- [55] Krennrich, D. *Erzeugung und Charakterisierung ultrakurzer Lichtimpulse von diodengepumpten modengekoppelten Festkörperlaser mit Neodym dotierten Lasermaterialien im Wellenlängenbereich von 0,9  $\mu\text{m}$  und 1,3  $\mu\text{m}$*  (Cuvillier Verlag, 2005)
- [56] Lauberau, A. und Brodschelm, A. *Überarbeitete Vorlesungsmitschrift Quantenoptik I* Techn. Ber. Technische Universität München (2003)
- [57] Meschede, D. *Optik, Licht, Laser* (Vieweg + Teubner, 2008)
- [58] Saleh, B.E. und Teich, M.C. *Grundlagen der Photonik* (Wiley-VCH, 2008)
- [59] Paschotta, R. *Encyclopedia of Laser Physics and Technology* (Wiley VCH Verlag GmbH, 2008)
- [60] Boyd, R.W. *Nonlinear Optics* (Academic Press, 2nd edition, 2003)
- [61] Shen, Y.R. *Principles of Nonlinear Optics* (Wiley VCH Verlagsgesellschaft, 1984)
- [62] Fermann, M., Andrejco, M., Silberberg, Y. und Stock, M. *Passive-mode locking by using nonlinear polarization evolution in a polarization-maintaining erbium-doped fiber* Opt. Lett. (1993) **18**: 894–896
- [63] Hofer, M., Ober, M., Haberl, F. und Fermann, M. *Characterization of ultrashort pulse formation in passively mode-locked fiber lasers* IEEE J. Quantum. Electron. (1992) **28**: 720–728
- [64] Ippen, E., Liu, L. und Haus, H. *Self-starting condition for additive-pulse mode-locked lasers* Opt. Lett. (1990) **15**: 183–185
- [65] Matsas, V., Newson, T., Richardson, D. und Payne, D. *Selfstarting passively mode-locked fibre ring soliton laser exploiting nonlinear polarisation rotation* Electron. Lett. (1992) **28**: 1391–1393
- [66] Tamura, K., Haus, H. und Ippen, E. *Self-starting additive pulse mode-locked erbium fibre ring laser* Electron. Lett. (1992) **28**: 2226–2228
- [67] Brabec, T., Spielmann, C., Curley, P.F. und Krausz, F. *Kerr lens mode locking* Opt. Lett. (1992) **17**: 1292–1294
- [68] Chen, S. und Wang, J. *Self-starting issues of passive self-focussing mode locking* Opt. Lett. (1991) **16**: 1689–1691
- [69] Herrmann, J. *Theory of Kerr-lens mode locking: role of self-focusing and radially varying gain* J. Opt. Soc. Am. B (1994) **11**: 498–512
- [70] Clark-Inc. *Manual zum Clark MXR, CPA 2001 Laser*

- [71] Moulton, P.F. *Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>* J. Opt. Soc. Am. B (1986) **3**: 125–133
- [72] Cheriaux, G., Rousseau, P., Salin, F., Chambaret, J.P., Walker, B. und Dimauro, L.F. *Aberration-free stretcher design for ultrashort-pulse amplification* Opt. Lett. (1996) **21**: 414–416
- [73] Treacy, E. *Optical pulse compression with diffraction gratings* IEEE J. Quantum. Electron. (1969) **5**: 454–458
- [74] Spectra Physics, Mountain View, C. *Operation Manual Tsunami* (2002)
- [75] Fork, R.L., Shank, C.V., Hirlimann, C., Yen, R. und Tomlinson, W.J. *Femtosecond white-light continuum pulses*. Opt. Lett. (1983) **8**: 1–3
- [76] Akozbek, N., Becker, A. und Chin, S. *Propagation and filamentation of femtosecond laser pulses in optical media* Laser Phys. (2005) **15**: 607–615
- [77] Kolesik, M., Katona, G., Moloney, J. und Wright, E. *Theory and simulation of supercontinuum generation in transparent bulk media* Appl. Phys. B: Lasers Opt. (2003) **77**: 185–195
- [78] Kolesik, M., Katona, G., Moloney, J. und Wright, E. *Physical factors limiting the spectral extent and band gap dependence of supercontinuum generation* Phys. Rev. Lett. (2003) **91**: 043905
- [79] Srivastava, A. und Goswami, D. *Control of supercontinuum generation with polarization of incident laser pulses* Appl. Phys. B: Lasers Opt. (2003) **77**: 325–328
- [80] Reed, M.K., Steinershepard, M.K., Armas, M.S. und Negus, D.K. *Microjoule-Energy Ultrafast Optical Parametric-Amplifiers* J. Opt. Soc. Am. B (1995) **12**: 2229–2236
- [81] Brodeur, A. und Chin, S. *Ultrafast white-light continuum generation and self-focusing in transparent condensed media* J. Opt. Soc. Am. B (1999) **16**: 637–650
- [82] Brodeur, A. und Chin, S. *Band-gap dependence of the ultrafast white-light continuum* Phys. Rev. Lett. (1998) **80**: 4406–4409
- [83] Kato, K. *2nd harmonic generation to 2048Å in β-BaB<sub>2</sub>O<sub>4</sub>* IEEE J. Quantum. Electron. (1986) **22**: 1013–1014
- [84] Baum, P., Lochbrunner, S., Gallmann, L., Steinmeyer, G., Keller, U. und Riedle, E. *Real-time characterization and optimal phase control of tunable visible pulses with a flexible compressor* Appl. Phys. B: Lasers Opt. (2002) **74**: 219–224
- [85] Riedle, E., Beutter, M., Lochbrunner, S., Piel, J., Schenkl, S., Sporlein, S. und Zinth, W. *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR* Appl. Phys. B: Lasers Opt. (2000) **71**: 457–465

- 
- [86] Wilhelm, T., Piel, J. und Riedle, E. *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter* Opt. Lett. (1997) **22**: 1494–1496
- [87] Duarte, F. *Generalized multiple-prism dispersion theory for laser pulse compression: higher order phase derivatives* Appl. Phys. B: Lasers Opt. (2009) **96**: 809–814
- [88] Fork, R.L., Martinez, O.E. und Gordon, J.P. *Negative dispersion using pairs of prisms* Opt. Lett. (1984) **9**: 150–152
- [89] Wilson, K. und Yakovlev, V. *Ultrafast rainbow: Tunable ultrashort pulses from a solid-state kilohertz system* J. Opt. Soc. Am. B (1997) **14**: 444–448
- [90] Ziegler, L., Morais, J., Zhou, Y., Constantine, S., Reed, M., Steiner-Shepard, M. und Lommel, D. *Tunable 50 fs pulse generation in the 250-310 nm ultraviolet range* IEEE J. Quantum. Electron. (1998) **34**: 1758–1764
- [91] Kozma, I.Z., Baum, P., Lochbrunner, S. und Riedle, E. *Widely tunable sub-30 fs ultraviolet pulses by chirped sum frequency mixing* Opt. Express (2003) **11**: 3110–3115
- [92] Dobryakov, A., Kovalenko, S. und Ernsting, N. *Electronic and vibrational coherence effects in broadband transient absorption spectroscopy with chirped supercontinuum probing* J. Chem. Phys. (2003) **119**: 988–1002
- [93] Dobryakov, A., Lustres, J.P., Kovalenko, S. und Ernsting, N. *Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications* Chem. Phys. (2008) **347**: 127–138 *ultrafast Photoinduced Processes in Polyatomic Molecules - Electronic Structure, Dynamics and Spectroscopy*
- [94] Dobryakov, A.L., Kovalenko, S.A. und Ernsting, N.P. *Coherent and sequential contributions to femtosecond transient absorption spectra of a rhodamine dye in solution.* J. Chem. Phys. (2005) **123**: 044502.1–044502.8
- [95] Kovalenko, S.A., Dobryakov, A.L., Ruthmann, J. und Ernsting, N.P. *Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing* Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys. (1999) **59**: 2369–2384
- [96] Sellmeier, W. *Zur Erklärung der abnormen Farbenfolge im Spektrum einiger Substanzen* Ann. Phys. Chem. (1871) **143**: 272–282
- [97] Bredenbeck, J., Helbing, J. und Hamm, P. *Transient two-dimensional infrared spectroscopy: Exploring the polarization dependence* J. Chem. Phys. (2004) **121**: 5943–5957
- [98] Rini, M. *Femtosecond Mid-Infrared Spectroscopy of Elementary Photoinduced Reactions* Dissertation Humboldt-Universität, Berlin (2003)

- [99] Wynne, K., Haran, G., Reid, G., Moser, C., Dutton, P. und Hochstrasser, R. *Femtosecond infrared spectroscopy of low-lying excited states in reaction centers of rhodobacter sphaeroides*. J. Phys. Chem. (1996) **100**: 5140–5148
- [100] Hartl, I. *Das Programm URMEL zur Anpassung zeitaufgelöster Messungen in der Ultrakurzzeitspektroskopie*. Praktikumsarbeit Ludwig-Maximilians-Universität, München (1993)
- [101] Bredenbeck, J., Helbing, J., Kolano, C. und Hamm, P. *Ultrafast 2D-IR spectroscopy of transient species*. ChemPhysChem (2007) **8**: 1747–1756
- [102] Hamm, P., Helbing, J. und Bredenbeck, J. *Two-dimensional infrared spectroscopy of photoswitchable peptides*. Annu. Rev. Phys. Chem. (2008) **59**: 291–317
- [103] Park, S., Kwak, K. und Fayer, M.D. *Ultrafast 2D-IR vibrational echo spectroscopy: a probe of molecular dynamics* Laser Phys. Lett. (2007) **4**: 704–718
- [104] Woutersen, S. und Hamm, P. *Nonlinear two-dimensional vibrational spectroscopy of peptides* J. Phys.: Condens. Matter (2002) **14**: 1035–1062
- [105] Bredenbeck, J. *Towards ultrafast structural dynamics of peptides and proteins* Dissertation Universität Zürich (2005)
- [106] Cerullo, G. und Silvestri, S.D. *Ultrafast optical parametric amplifiers* Rev. Sci. Instrum. (2003) **74**: 1–18
- [107] Petrov, V., Noack, F. und Stolzenberger, R. *Seeded femtosecond optical parametric amplification in the mid-infrared spectral region above 3  $\mu\text{m}$*  Appl. Opt. (1997) **36**: 1164–1172
- [108] Petrov, V. und Noack, F. *Mid-infrared femtosecond optical parametric amplification in potassium niobate* Opt. Lett. (1996) **21**: 1576–1578
- [109] Rotermund, F., Petrov, V., Noack, F., Wittmann, M. und Korn, G. *Laser-diode-seeded operation of a femtosecond optical parametric amplifier with  $\text{MgO} : \text{LiNbO}_3$  and generation of 5-cycle pulses near 3  $\mu\text{m}$*  J. Opt. Soc. Am. B (1999) **16**: 1539–1545
- [110] Petrov, V., Rotermund, F. und Noack, F. *Generation of high-power femtosecond light pulses at 1 kHz in the mid-infrared spectral range between 3 and 12  $\mu\text{m}$  by second-order nonlinear processes in optical crystals* J. Opt. A: Pure Appl. Opt. (2001) **3**: R1–R19
- [111] Seifert, F., Petrov, V. und Woerner, M. *Solid state laser systems for the generation of midinfrared femtosecond pulses tunable from 3.3  $\mu\text{m}$  to 10  $\mu\text{m}$*  Opt. Lett. (1994) **19**: 2009–2011
- [112] Hamm, P., Kaindl, R.A. und Stenger, J. *Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources* Opt. Lett. (2000) **25**: 1798–1800

- 
- [113] Fattinger, C. und Grischkowsky, D. *Terahertz beams* Appl. Phys. Lett. (1989) **54**: 490–492
- [114] Xu, L., Zhang, X.C. und Auston, D.H. *Terahertz beam generation by femtosecond optical pulses in electro-optic materials* Appl. Phys. Lett. (1992) **61**: 1784–1786
- [115] Kaindl, R.A., Smith, D.C., Joschko, M., Hasselbeck, M.P., Woerner, M. und Elsaesser, T. *Femtosecond infrared pulses tunable from 9 to 18  $\mu\text{m}$  at an 88 MHz repetition rate* Opt. Lett. (1998) **23**: 861–863
- [116] Neumann, K. *Untersuchung ultraschneller Strukturdynamik photoschaltbarer Moleküle mittels Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*. Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (2010)
- [117] Ekvall, K., van der Meulen, P., Dhollande, C., Berg, L.E., Pommeret, S., Naskrecki, R. und Mialocq, J.C. *Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy* J. Appl. Phys. (2000) **87**: 2340–2352
- [118] Lorenc, M., Ziolk, M., Naskrecki, R., Karolczak, J., Kubicki, J. und Maciejewski, A. *Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy* Appl. Phys. B: Lasers Opt. (2002) **74**: 19–27
- [119] Hamm, P. *Coherent effects in femtosecond infrared-spectroscopy* Chem. Phys. (1995) **200**: 415–429
- [120] Wynne, K. und Hochstrasser, R.M. *The theory of ultrafast vibrational spectroscopy* Chem. Phys. (1995) **193**: 211–236
- [121] Förster, U., Goldenhoff, N., Grünewald, C., Engels, J.W. und Wachtveitl, J. *Photophysics of 1-ethynylpyrene modified RNA base adenine* J. Lumines. (2009) **129**: 1454–1458
- [122] Norrish, R. und Porter, G. *Chemical reactions produced by very high light intensities* Nature (1949) **164**: 658
- [123] Woodgate, G.K. *Elementary Atomic Structure* (Oxford University Press, 1983)
- [124] van't Hoff, J.H. *E'tudes de dynamique chimique* (Frederik Muller, Amsterdam, 1884)
- [125] Arrhenius, S. *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren*. Z. Phys. Chem. (1889) **4**: 226–248
- [126] Eyring, H. *The activated complex in chemical reactions* J. Chem. Phys. (1935) **3**: 107–115
- [127] Wang, J.P., Yoo, S.K., Song, L. und El-Sayed, M.A. *Molecular Mechanism of the Differential Photoelectric Response of Bacteriorhodopsin* J. Phys. Chem. B (1997) **101**: 3420–3423

- [128] Váró, G. *Dried oriented purple membrane samples*. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. (1981) **32**: 301–310
- [129] Keszthelyi, L. und Ormos, P. *Electric signals associated with the photocycle of bacteriorhodopsin* FEBS Lett. (1980) **109**: 189–193
- [130] Gröbner, G., Taylor, A., Williamson, P.T.F., Choi, G., Glaubitz, C., Watts, J.A., de Grip, W.J. und Watts, A. *Macroscopic Orientation of Natural and Model Membranes for Structural Studies* Anal. Biochem. (1997) **254**: 132–138
- [131] Oesterhelt, D. und Stoeckenius, W. *Functions of a New Photoreceptor Membrane* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1973) **70**: 2853–2857
- [132] Oesterhelt, D. und Stoeckenius, W. *Rhodopsin-Like Protein from Purple Membrane of Halobacterium-Halobium* Nat. New Biol. (1971) **233**: 149–152
- [133] Haupts, U., Tittor, J. und Oesterhelt, D. *Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule* Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (1999) **28**: 367–399
- [134] Trissl, H.W. und Montal, M. *Electrical demonstration of rapid light-induced conformational changes in bacteriorhodopsin* Nature (1977) **266**: 655–657
- [135] Michel, H. und Oesterhelt, D. *Light-induced changes of the pH gradient and the membrane potential in H. halobium*. FEBS Lett. (1976) **65**: 175–178
- [136] Essen, L., Siegert, R., Lehmann, W.D. und Oesterhelt, D. *Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1998) **95**: 11673–11678
- [137] Lemke, H.D. und Oesterhelt, D. *Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin*. FEBS Lett. (1981) **128**: 255–260
- [138] Landau, E.M. und Rosenbusch, J.P. *Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1996) **93**: 14532–14535
- [139] Luecke, H., Richter, H.T. und Lanyi, J.K. *Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution*. Science (1998) **280**: 1934–1937
- [140] Belrhali, H., Nollert, P., Royant, A., Menzel, C., Rosenbusch, J.P., Landau, E.M. und Pebay-Peyroula, E. *Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution*. Structure (1999) **7**: 909–917
- [141] Edman, K., Nollert, P., Royant, A., Belrhali, H., Pebay-Peyroula, E., Hajdu, J., Neutze, R. und Landau, E.M. *High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle* Nature (1999) **401**: 822–826

- [142] Schobert, B., Cupp-Vickery, J., Hornak, V., Smith, S. und Lanyi, J. *Crystallographic structure of the K intermediate of bacteriorhodopsin: conservation of free energy after photoisomerization of the retinal* J. Mol. Biol. (2002) **321**: 715–726
- [143] Lanyi, J.K. und Schobert, B. *Structural changes in the L photointermediate of bacteriorhodopsin*. J. Mol. Biol. (2007) **365**: 1379–1392
- [144] Matsui, Y., Sakai, K., Murakami, M., Shiro, Y., ichi Adachi, S., Okumura, H. und Kouyama, T. *Specific damage induced by X-ray radiation and structural changes in the primary photoreaction of bacteriorhodopsin*. J. Mol. Biol. (2002) **324**: 469–481
- [145] Schobert, B., Brown, L.S. und Lanyi, J.K. *Crystallographic structures of the M and N intermediates of bacteriorhodopsin: assembly of a hydrogen-bonded chain of water molecules between Asp-96 and the retinal Schiff base* J. Mol. Biol. (2003) **330**: 553–570
- [146] Rouhani, S., Cartailier, J.P., Facciotti, M.T., Walian, P., Needleman, R., Lanyi, J.K., Glaeser, R.M. und Luecke, H. *Crystal structure of the D85S mutant of bacteriorhodopsin: model of an O-like photocycle intermediate* J. Mol. Biol. (2001) **313**: 615–628
- [147] Takeda, K., Matsui, Y., Kamiya, N., Adachi, S., Okumura, H. und Kouyama, T. *Crystal structure of the M intermediate of bacteriorhodopsin: Allosteric structural changes mediated by sliding movement of a transmembrane helix* J. Mol. Biol. (2004) **341**: 1023–1037
- [148] Yamamoto, M., Hayakawa, N., Murakami, M. und Kouyama, T. *Crystal Structures of Different Substates of Bacteriorhodopsin's M Intermediate at Various pH Levels* J. Mol. Biol. (2009) **393**: 559–573
- [149] Lanyi, J.K. *X-ray diffraction of bacteriorhodopsin photocycle intermediates*. Mol. Membr. Biol. (2004) **21**: 143–150
- [150] Lozier, R.H., Bogomolni, R.A. und Stoeckenius, W. *Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in Halobacterium Halobium*. Biophys. J. (1975) **15**: 955–962
- [151] Harbison, G.S., Smith, S.O., Pardoen, J.A., Winkel, C., Lugtenburg, J., Herzfeld, J., Mathies, R. und Griffin, R.G. *Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis, 15-syn and all-trans, 15-anti retinal Schiff bases*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1984) **81**: 1706–1709
- [152] Scherrer, P., Mathew, M.K., Sperling, W. und Stoeckenius, W. *Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers* Biochemistry (1989) **28**: 829–834
- [153] Tittor, J., Paula, S., Subramaniam, S., Heberle, J., Henderson, R. und Oesterhelt, D. *Proton translocation by bacteriorhodopsin in the absence of substantial conformational changes*. J. Mol. Biol. (2002) **319**: 555–565

- [154] Aton, B., Callender, R.H., Becher, B. und Ebrey, T.G. *Resonance raman studies of purple membrane* Biochemistry (1977) **16**: 2995–2999
- [155] Braiman, M. und Mathies, R. *Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: evidence for a distorted 13-cis retinal chromophore*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1982) **79**: 403–407
- [156] Govindjee, R., Balashov, S.P. und Ebrey, T.G. *Quantum efficiency of the photochemical cycle of bacteriorhodopsin*. Biophys. J. (1990) **58**: 597–608
- [157] Logunov, S.L., ElSayed, M.A., Song, L. und Lanyi, J.K. *Photoisomerization quantum yield and apparent energy content of the K intermediate in the photocycles of bacteriorhodopsin, its mutants D85N, R82Q, and D212N, and deionized blue bacteriorhodopsin* J. Phys. Chem. (1996) **100**: 2391–2398
- [158] Pande, J., Callender, R.H. und Ebrey, T.G. *Resonance Raman study of the primary photochemistry of bacteriorhodopsin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1981) **78**: 7379–7382
- [159] Siebert, F. und Mantele, W. *Investigation of the Primary Photochemistry of Bacteriorhodopsin by Low-Temperature Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy* Eur. J. Biochem. (1983) **130**: 565–573
- [160] Alfano, R.R., Govindjee, R., Becher, B. und Ebrey, T.G. *Picosecond kinetics of the fluorescence from the chromophore of the purple membrane protein of Halobacterium halobium*. Biophys. J. (1976) **16**: 541–545
- [161] Hsieh, C.L., Nagumo, M., Nicol, M. und El-Sayed, M.A. *Picosecond and nanosecond resonance Raman studies of bacteriorhodopsin. Do configurational changes of retinal occur in picoseconds?* J. Phys. Chem. (1981) **85**: 2714–2717
- [162] Ippen, E.P., Shank, C.V., Lewis, A. und Marcus, M.A. *Subpicosecond spectroscopy of bacteriorhodopsin* Science (1978) **200**: 1279–1281
- [163] Kaufmann, K.J., Rentzepis, P.M., Stoerkenius, W. und Lewis, A. *Primary photochemical processes in bacteriorhodopsin*. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1976) **68**: 1109–1115
- [164] Sharkov, A.V., Pakulev, A.V., Chekalin, S.V. und Matveetz, Y.A. *Primary Events in Bacteriorhodopsin Probed by Subpicosecond Spectroscopy* Biochim. Biophys. Acta (1985) **808**: 94–102
- [165] Dobler, J., Zinth, W., Kaiser, W. und Oesterhelt, D. *Excited-State Reaction Dynamics of Bacteriorhodopsin Studied by Femtosecond Spectroscopy* Chem. Phys. Lett. (1988) **144**: 215–220

- [166] Nuss, M.C., Zinth, W., Kaiser, W., Kölling, E. und Oesterhelt, D. *Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin* Chem. Phys. Lett. (1985) **117**: 1–7
- [167] Doig, S.J., Reid, P.J. und Mathies, R.A. *Picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin's J, K, and KL intermediates* J. Phys. Chem. (1991) **95**: 6372–6379
- [168] Mathies, R.A., Cruz, C.H.B., Pollard, W.T. und Shank, C.V. *Direct Observation of the Femtosecond Excited-State Cis-Trans Isomerization in Bacteriorhodopsin* Science (1988) **240**: 777–779
- [169] Herbst, J., Heyne, K. und Diller, R. *Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization* Science (2002) **297**: 822–825
- [170] Gai, F., Hasson, K.C., McDonald, J.C. und Anfinrud, P.A. *Chemical dynamics in proteins: The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin* Science (1998) **279**: 1886–1891
- [171] Du, M. und Fleming, G.R. *Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Bacteriorhodopsin - Direct Observation of Excited-State Dynamics in the Primary Step of the Proton Pump Cycle* Biophys. Chem. (1993) **48**: 101–111
- [172] Haacke, S., Schenkl, S., Vinzani, S. und Chergui, M. *Femtosecond and picosecond fluorescence of native bacteriorhodopsin and a nonisomerizing analog* Biopolymers (2002) **67**: 306–309
- [173] Schmidt, B., Sobotta, C., Heinz, B., Laimgruber, S., Braun, M. und Gilch, P. *Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy* Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. (2005) **1706**: 165–173
- [174] Lutz, I., Sieg, A., Wegener, A.A., Engelhard, M., Boche, I., Otsuka, M., Oesterhelt, D., Wachtveitl, J. und Zinth, W. *Primary reactions of sensory rhodopsins* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2001) **98**: 962–967
- [175] Polland, H.J., Franz, M.A., Zinth, W., Kaiser, W., Kölling, E. und Oesterhelt, D. *Early Picosecond Events in the Photocycle of Bacteriorhodopsin* Biophys. J. (1986) **49**: 651–662
- [176] Birge, R.R. *Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin*. Biochim. Biophys. Acta (1990) **1016**: 293–327
- [177] Warshel, A. und Parson, W.W. *Dynamics of biochemical and biophysical reactions: insight from computer simulations*. Q. Rev. Biophys. (2001) **34**: 563–679
- [178] Atkinson, G.H., Brack, T.L., Blanchard, D. und Rumbles, G. *Picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy of the initial trans to cis isomerization in the bacteriorhodopsin photocycle* Chem. Phys. (1989) **131**: 1–15

- [179] van den Berg, R., Jang, D.J., Bitting, H.C. und El-Sayed, M.A. *Subpicosecond resonance raman-spectra of the early intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin* Biophys. J. (1990) **58**: 135–141
- [180] Shim, S., Dasgupta, J. und Mathies, R.A. *Femtosecond time-resolved stimulated Raman reveals the birth of bacteriorhodopsin's J and K intermediates.* J. Am. Chem. Soc. (2009) **131**: 7592–7597
- [181] Diller, R., Maiti, S., Walker, G.C., Cowen, B.R., Pippenger, R., Bogomolni, R.A. und Hochstrasser, R.M. *Femtosecond Time-Resolved Infrared-Laser Study of the J-K Transition of Bacteriorhodopsin* Chem. Phys. Lett. (1995) **241**: 109–115
- [182] Aharoni, A., Hou, B., Friedman, N., Ottolenghi, M., Rousso, I., Ruhman, S., Sheves, M., Ye, T. und Zhong, Q. *Non-isomerizable artificial pigments: implications for the primary light-induced events in bacteriorhodopsin.* Biochemistry (Moscow) (2001) **66**: 1210–1219
- [183] Ye, T., Friedman, N., Gat, Y., Atkinson, G.H., Sheves, M., Ottolenghi, M. und Ruhman, S. *On the Nature of the Primary Light-Induced Events in Bacteriorhodopsin: Ultrafast Spectroscopy of Native and C13=C14 Locked Pigments* J. Phys. Chem. B (1999) **103**: 5122–5130
- [184] Zhong, Q., Ruhman, S., Ottolenghi, M., Sheves, M., Friedman, N., Atkinson, G.H. und Delaney, J.K. *Reexamining the primary light-induced events in bacteriorhodopsin using a synthetic C-13=C-14-locked chromophore* J. Am. Chem. Soc. (1996) **118**: 12828–12829
- [185] Song, L. und El-Sayed, M.A. *Primary step in bacteriorhodopsin photosynthesis: Bond stretch rather than angle twist of its retinal excited-state structure* J. Am. Chem. Soc. (1998) **120**: 8889–8890
- [186] Garavelli, M., Celani, P., Bernardi, F., Robb, M.A. und Olivucci, M. *The C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>+ protonated Schiff base: An ab initio minimal model for retinal photoisomerization* J. Am. Chem. Soc. (1997) **119**: 6891–6901
- [187] Garavelli, M., Vreven, T., Celani, P., Bernardi, F., Robb, M.A. und Olivucci, M. *Photoisomerization path for a realistic retinal chromophore model: The nonatetraiminium cation* J. Am. Chem. Soc. (1998) **120**: 1285–1288
- [188] Gonzalez-Luque, R., Garavelli, M., Bernardi, F., Merchan, M., Robb, M.A. und Olivucci, M. *Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2000) **97**: 9379–9384
- [189] Warshel, A. und Chu, Z.T. *Nature of the surface crossing process in bacteriorhodopsin: Computer simulations of the quantum dynamics of the primary photochemical event* J. Phys. Chem. B (2001) **105**: 9857–9871

- [190] Atkinson, G.H., Ujj, L. und Zhou, Y.D. *Vibrational spectrum of the J-625 intermediate in the room temperature bacteriorhodopsin photocycle* J. Phys. Chem. A (2000) **104**: 4130–4139
- [191] Terentis, A.C., Ujj, L., Abramczyk, H. und Atkinson, G.H. *Primary events in the bacteriorhodopsin photocycle: Torsional vibrational dephasing in the first excited electronic state* Chem. Phys. (2005) **313**: 51–62
- [192] Terentis, A.C., Zhou, Y., Atkinson, G.H. und Ujj, L. *Picosecond Time-Resolved Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy of the Artificial Bacteriorhodopsin Pigment, BR6.11* J. Phys. Chem. A (2003) **107**: 10787–10797
- [193] Ujj, L., Zhou, Y., Sheves, M., Ottolenghi, M., Ruhman, S. und Atkinson, G.H. *Vibrational Spectrum of a Picosecond Intermediate in the Artificial BR5.12 Photochemical Reaction: Picosecond Time-Resolved CARS of T5.12* J. Am. Chem. Soc. (2000) **122**: 96–106
- [194] McCamant, D.W., Kukura, P. und Mathies, R.A. *Femtosecond Stimulated Raman Study of Excited-State Evolution in Bacteriorhodopsin* J. Phys. Chem. B (2005) **109**: 10449–10457
- [195] Abramczyk, H. *Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin and its retinal modified analogs: Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle* J. Chem. Phys. (2004) **120**: 11120–11132
- [196] Ben-Nun, M., Molnar, F., Lu, H., Phillips, J.C., Martínez, T.J. und Schulten, K. *Quantum dynamics of the femtosecond photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin*. Faraday Discuss. (1998) **110**: 447–520
- [197] Humphrey, W., Lu, H., Logunov, I., Werner, H.J. und Schulten, K. *Three electronic state model of the primary phototransformation of bacteriorhodopsin*. Biophys. J. (1998) **75**: 1689–1699
- [198] Hasson, K.C., Gai, F. und Anfinrud, P.A. *The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three-state model* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1996) **93**: 15124–15129
- [199] Lanyi, J.K. und Schobert, B. *Mechanism of proton transport in bacteriorhodopsin from crystallographic structures of the K, L, M1, M2, and M2' intermediates of the photocycle*. J. Mol. Biol. (2003) **328**: 439–450
- [200] Maeda, A., Kandori, H., Yamazaki, Y., Nishimura, S., Hatanaka, M., Chon, Y.S., Sasaki, J., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *Intramembrane signaling mediated by hydrogen-bonding of water and carboxyl groups in bacteriorhodopsin and rhodopsin*. J. Biochem. (1997) **121**: 399–406

- [201] Rammelsberg, R., Huhn, G., Lübber, M. und Gerwert, K. *Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network* Biochemistry (1998) **37**: 5001–5009
- [202] Zscherp, C. und Heberle, J. *Infrared difference spectra of the intermediates L, M, N, and O of the bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy* J. Phys. Chem. B (1997) **101**: 10542–10547
- [203] Richter, H.T., Brown, L.S., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *A linkage of the pKas of asp-85 and glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin.* Biochemistry (1996) **35**: 4054–4062
- [204] Alexiev, U., Mollaaghababa, R., Scherrer, P., Khorana, H.G. und Heyn, M.P. *Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1995) **92**: 372–376
- [205] Heberle, J. und Dencher, N.A. *Surface-bound optical probes monitor protein translocation and surface potential changes during the bacteriorhodopsin photocycle.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1992) **89**: 5996–6000
- [206] Zimányi, L., Váró, G., Chang, M., Ni, B., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *Pathways of proton release in the bacteriorhodopsin photocycle.* Biochemistry (1992) **31**: 8535–8543
- [207] Váró, G. und Lanyi, J.K. *Thermodynamics and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle.* Biochemistry (1991) **30**: 5016–5022
- [208] Subramaniam, S. und Henderson, R. *Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin* Nature (2000) **406**: 653–657
- [209] Herzfeld, J. und Tounge, B. *NMR probes of vectoriality in the proton-motive photocycle of bacteriorhodopsin: evidence for an electrostatic steering mechanism* Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. (2000) **1460**: 95–105
- [210] Royant, A., Edman, K., Ursby, T., Pebay-Peyroula, E., Landau, E.M. und Neutze, R. *Helix deformation is coupled to vectorial proton transport in the photocycle of bacteriorhodopsin* Nature (2000) **406**: 645–648
- [211] Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Govindjee, R. und Ebrey, T.G. *Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release.* Biophys. J. (1996) **70**: 473–481
- [212] Brown, L.S., Dioumaev, A.K., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *Local-access model for proton transfer in bacteriorhodopsin* Biochemistry (1998) **37**: 3982–3993
- [213] Brown, L.S., Dioumaev, A.K., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *Connectivity of the retinal Schiff base to Asp85 and Asp96 during the bacteriorhodopsin photocycle: the local-access model.* Biophys. J. (1998) **75**: 1455–1465

- [214] Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J. und Oesterhelt, D. *Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1989) **86**: 4943–4947
- [215] Otto, H., Marti, T., Holz, M., Mogi, T., Lindau, M., Khorana, H.G. und Heyn, M.P. *Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1989) **86**: 9228–9232
- [216] Cao, Y., Váró, G., Chang, M., Ni, B.F., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *Water is required for proton-transfer from aspartate-96 to the bacteriorhodopsin Schiff-base* Biochemistry (1991) **30**: 10972–10979
- [217] Száráz, S., Oesterhelt, D. und Ormos, P. *pH-induced structural changes in bacteriorhodopsin studied by Fourier transform infrared spectroscopy*. Biophys. J. (1994) **67**: 1706–1712
- [218] Brown, L.S. und Lanyi, J.K. *Determination of the transiently lowered pKa of the retinal Schiff base during the photocycle of bacteriorhodopsin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1996) **93**: 1731–1734
- [219] Váró, G. und Lanyi, J.K. *Effects of hydrostatic pressure on the kinetics reveal a volume increase during the bacteriorhodopsin photocycle*. Biochemistry (1995) **34**: 12161–12169
- [220] Váró, G. und Lanyi, J.K. *Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration* Biophys. J. (1991) **59**: 313–322
- [221] Nagle, J.F. und Tristram-Nagle, S. *Hydrogen bonded chain mechanisms for proton conduction and proton pumping* J. Membr. Biol. (1983) **74**: 1–14
- [222] Oka, T., Yagi, N., Fujisawa, T., Kamikubo, H., Tokunaga, F. und Kataoka, M. *Time-resolved x-ray diffraction reveals multiple conformations in the M-N transition of the bacteriorhodopsin photocycle*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2000) **97**: 14278–14282
- [223] Oka, T., Kamikubo, H., Tokunaga, F., Lanyi, J.K., Needleman, R. und Kataoka, M. *Conformational change of helix G in the bacteriorhodopsin photocycle: investigation with heavy atom labeling and x-ray diffraction*. Biophys. J. (1999) **76**: 1018–1023
- [224] Kamikubo, H., Kataoka, M., Váró, G., Oka, T., Tokunaga, F., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *Structure of the N intermediate of bacteriorhodopsin revealed by x-ray diffraction*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1996) **93**: 1386–1390
- [225] Xiao, W., Brown, L.S., Needleman, R., Lanyi, J.K. und Shin, Y.K. *Light-induced rotation of a transmembrane alpha-helix in bacteriorhodopsin*. J. Mol. Biol. (2000) **304**: 715–721

- [226] Thorgeirsson, T.E., Xiao, W., Brown, L.S., Needleman, R., Lanyi, J.K. und Shin, Y.K. *Transient channel-opening in bacteriorhodopsin: an EPR study*. J. Mol. Biol. (1997) **273**: 951–957
- [227] Radzwill, N., Gerwert, K. und Steinhoff, H.J. *Time-resolved detection of transient movement of helices F and G in doubly spin-labeled bacteriorhodopsin*. Biophys. J. (2001) **80**: 2856–2866
- [228] Gerwert, K., Souvignier, G. und Hess, B. *Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1990) **87**: 9774–9778
- [229] Checover, S., Marantz, Y., Nachliel, E., Gutman, M., Pfeiffer, M., Tittor, J., Oesterhelt, D. und Dencher, N.A. *Dynamics of the proton transfer reaction on the cytoplasmic surface of bacteriorhodopsin*. Biochemistry (2001) **40**: 4281–4292
- [230] Checover, S., Nachliel, E., Dencher, N.A. und Gutman, M. *Mechanism of proton entry into the cytoplasmic section of the proton-conducting channel of bacteriorhodopsin*. Biochemistry (1997) **36**: 13919–13928
- [231] Rink, T., Riesle, J., Oesterhelt, D., Gerwert, K. und Steinhoff, H.J. *Spin-labeling studies of the conformational changes in the vicinity of D36, D38, T46, and E161 of bacteriorhodopsin during the photocycle*. Biophys. J. (1997) **73**: 983–993
- [232] Riesle, J., Oesterhelt, D., Dencher, N.A. und Heberle, J. *D38 is an essential part of the proton translocation pathway in bacteriorhodopsin*. Biochemistry (1996) **35**: 6635–6643
- [233] Smith, S.O., Pardo, J.A., Mulder, P., Curry, B., Lugtenburg, J. und Mathies, R.A. *Chromophore structure in bacteriorhodopsin's O<sub>640</sub> photointermediate*. Biochemistry (1983) **22**: 6141–6148
- [234] Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Needleman, R. und Lanyi, J.K. *Fourier transform infrared spectra of a late intermediate of the bacteriorhodopsin photocycle suggest transient protonation of Asp-212*. Biochemistry (1999) **38**: 10070–10078
- [235] Zscherp, C., Schlesinger, R. und Heberle, J. *Time-resolved FT-IR spectroscopic investigation of the pH-dependent proton transfer reactions in the E194Q mutant of bacteriorhodopsin*. Biochem. Biophys. Res. Commun. (2001) **283**: 57–63
- [236] Lanyi, J.K. *The local-access mechanism of proton transport by bacteriorhodopsin*. Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. (1998) **1365**: 17–22
- [237] Haupts, U., Tittor, J., Bamberg, E. und Oesterhelt, D. *General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: The isomerization/switch/transfer (IST) model*. Biochemistry (1997) **36**: 2–7

- [238] Tittor, J., Haupts, U., Haupts, C., Oesterhelt, D., Becker, A. und Bamberg, E. *Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T: Different modes of ion translocation in a retinal protein* J. Mol. Biol. (1997) **271**: 405–416
- [239] Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y.H., Falcón, L.I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Karl, D.M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M.R., Strausberg, R.L., Nealson, K., Friedman, R., Frazier, M. und Venter, J.C. *The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific*. PLoS Biol. (2007) **5**: e77
- [240] Sabehi, G., Massana, R., Bielawski, J.P., Rosenberg, M., Delong, E.F. und Beja, O. *Novel proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas* Environ. Microbiol. (2003) **5**: 842–849
- [241] Man, D.L., Wang, W.W., Sabehi, G., Aravind, L., Post, A.F., Massana, R., Spudich, E.N., Spudich, J.L. und Beja, O. *Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins* EMBO J. (2003) **22**: 1725–1731
- [242] Dioumaev, A., Wang, J., Balint, Z., Váró, G. und Lanyi, J. *Proton transport by proteorhodopsin requires that the retinal Schiff base counterion Asp-97 be anionic*. Biochemistry (2003) **42**: 6582–6587
- [243] Kralj, J.M., Bergo, V.B., Amsden, J.J., Spudich, E.N., Spudich, J.L. und Rothschild, K.J. *Protonation state of Glu142 differs in the green- and blue-absorbing variants of proteorhodopsin*. Biochemistry (2008) **47**: 3447–3453
- [244] Krebs, R., Alexiev, U., Partha, R., DeVita, A. und Braiman, M. *Detection of fast light-activated H<sup>+</sup> release and M intermediate formation from proteorhodopsin*. BMC Physiol. (2002) **2**: 5–13
- [245] Wang, W.W., Sineshchekov, O.A., Spudich, E.N. und Spudich, J.L. *Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin* J. Biol. Chem. (2003) **278**: 33985–33991
- [246] Hillebrecht, J.R., Galan, J., Rangarajan, R., Ramos, L., McCleary, K., Ward, D.E., Stuart, J.A. und Birge, R.R. *Structure, function, and wavelength selection in blue-absorbing proteorhodopsin* Biochemistry (2006) **45**: 1579–1590
- [247] Kralj, J.M., Spudich, E.N., Spudich, J.L. und Rothschild, K.J. *Raman spectroscopy reveals direct chromophore interactions in the Leu/Gln105 spectral tuning switch of proteorhodopsins*. J. Phys. Chem. B (2008) **112**: 11770–11776

- [248] Klyszejko, A.L., Shastri, S., Mari, S.A., Grubmüller, H., Müller, D.J. und Glaubitz, C. *Folding and assembly of proteorhodopsin* J. Mol. Biol. (2008) **376**: 35–41
- [249] Shastri, S., Vonck, J., Pflieger, N., Haase, W., Kühlbrandt, W. und Glaubitz, C. *Proteorhodopsin: Characterisation of 2D crystals by electron microscopy and solid state NMR* Biochim. Biophys. Acta (2007) **1768**: 3012–3019
- [250] Pflieger, N., Lorch, M., Wörner, A., Shastri, S. und Glaubitz, C. *Characterisation of Schiff base and chromophore in green proteorhodopsin by solid-state NMR* J. Biomol. NMR (2008) **40**: 15–21
- [251] Pflieger, N., Wörner, A., Yang, J., Shastri, S., Hellmich, U., Aslimovska, L., Maier, M. und Glaubitz, C. *Solid-state NMR and functional studies on proteorhodopsin* Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. (2009) **1787**: 697–705
- [252] Shi, L., Ahmed, M.A.M., Zhang, W., Whited, G., Brown, L.S. und Ladizhansky, V. *Three-dimensional solid-state NMR study of a seven-helical integral membrane proton pump—structural insights*. J. Mol. Biol. (2009) **386**: 1078–1093
- [253] Bergo, V., Amsden, J.J., Spudich, E.N., Spudich, J.L. und Rothschild, K.J. *Structural changes in the photoactive site of proteorhodopsin during the primary photo-reaction* Biochemistry (2004) **43**: 9075–9083
- [254] Bergo, V.B., Sineshchekov, O.A., Kralj, J.M., Partha, R., Spudich, E.N., Rothschild, K.J. und Spudich, J.L. *His-75 in proteorhodopsin, a novel component in light-driven proton translocation by primary pumps* J. Biol. Chem. (2009) **284**: 2836–2843
- [255] Dioumaev, A.K., Brown, L.S., Shih, J., Spudich, E.N., Spudich, J.L. und Lanyi, J.K. *Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin* Biochemistry (2002) **41**: 5348–5358
- [256] Furutani, Y., Ikeda, D., Shibata, M. und Kandori, H. *Strongly hydrogen-bonded water molecule is observed only in the alkaline form of proteorhodopsin* Chem. Phys. (2006) **324**: 705–708
- [257] Ikeda, D., Furutani, Y. und Kandori, H. *FTIR study of retinal Schiff base and internal water molecules of proteorhodopsin* Biochemistry (2007) **46**: 5365–5373
- [258] Imasheva, E.S., Balashov, S.P., Wang, J.M., Dioumaev, A.K. und Lanyi, J.K. *Selectivity of retinal photoisomerization in proteorhodopsin is controlled by aspartic acid 227* Biochemistry (2004) **43**: 1648–1655
- [259] Imasheva, E.S., Shimono, K., Balashov, S.P., Wang, J.M., Zadok, U., Sheves, M., Kamo, N. und Lanyi, J.K. *Formation of a long-lived photoproduct with a deprotonated Schiff base in proteorhodopsin, and its enhancement by mutation of Asp227* Biochemistry (2005) **44**: 10828–10838

- [260] Xiao, Y.W., Partha, R., Krebs, R. und Braiman, M. *Time-resolved FTIR spectroscopy of the photointermediates involved in fast transient H<sup>+</sup> release by proteorhodopsin* J. Phys. Chem. B (2005) **109**: 634–641
- [261] Rangarajan, R., Galan, J.F., Whited, G. und Birge, R.R. *Mechanism of spectral tuning in green-absorbing proteorhodopsin* Biochemistry (2007) **46**: 12679–12686
- [262] Liang, H., Whited, G., Nguyen, C. und Stucky, G.D. *The directed cooperative assembly of proteorhodopsin into 2D and 3D polarized arrays*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2007) **104**: 8212–8217
- [263] Partha, R., Krebs, R., Caterino, T.L. und Braiman, M.S. *Weakened coupling of conserved arginine to the proteorhodopsin chromophore and its counterion implies structural differences from bacteriorhodopsin*. Biochim. Biophys. Acta (2005) **1708**: 6–12
- [264] Govindjee, R., Misra, S., Balashov, S.P., Ebrey, T.G., Crouch, R.K. und Menick, D.R. *Arginine-82 regulates the pK<sub>a</sub> of the group responsible for the light-driven proton release in bacteriorhodopsin*. Biophys. J. (1996) **71**: 1011–1023
- [265] Hutson, M.S., Alexiev, U., Shilov, S.V., Wise, K.J. und Braiman, M.S. *Evidence for a perturbation of arginine-82 in the bacteriorhodopsin photocycle from time-resolved infrared spectra*. Biochemistry (2000) **39**: 13189–13200
- [266] Subramaniam, S., Marti, T. und Khorana, H.G. *Protonation state of Asp (Glu)-85 regulates the purple-to-blue transition in bacteriorhodopsin mutants Arg-82—Ala and Asp-85—Glu: the blue form is inactive in proton translocation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1990) **87**: 1013–1017
- [267] Lanyi, J.K. *Molecular mechanism of ion transport in bacteriorhodopsin: Insights from crystallographic, spectroscopic, kinetic, and mutational studies* J. Phys. Chem. B (2000) **104**: 11441–11448
- [268] Krebs, R.A., Dunmire, D., Partha, R. und Braiman, M.S. *Resonance Raman characterization of proteorhodopsin's chromophore environment* J. Phys. Chem. B (2003) **107**: 7877–7883
- [269] Herz, J. *Untersuchung der primären Photodynamik von Proteorhodopsin mit spezifisch modifiziertem Protonenakzeptorkomplex* Masterarbeit Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main (2010)
- [270] Sharaabi, Y., Brumfeld, V. und Sheves, M. *Binding of Anions to Proteorhodopsin Affects the Asp97 pK<sub>a</sub>* Biochemistry (2010) **49**: 4457–4465
- [271] Luecke, H., Schobert, B., Stagno, J., Imasheva, E.S., Wang, J.M., Balashov, S.P. und Lanyi, J.K. *Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2008) **105**: 16561–16565

- [272] Huber, R., Köhler, T., Lenz, M.O., Bamberg, E., Kalmbach, R., Engelhard, M. und Wachtveitl, J. *pH-dependent photoisomerization of retinal in proteorhodopsin* Biochemistry (2005) **44**: 1800–1806
- [273] Lenz, M.O., Huber, R., Schmidt, B., Gilch, P., Kalmbach, R., Engelhard, M. und Wachtveitl, J. *First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin* Biophys. J. (2006) **91**: 255–262
- [274] Rupenyany, A., van Stokkum, I.H.M., Arents, J.C., van Grondelle, R., Hellingwerf, K.J. und Groot, M.L. *Reaction Pathways of Photoexcited Retinal in Proteorhodopsin Studied by Pump-Dump-Probe Spectroscopy* J. Phys. Chem. B (2009) **113**: 16251–16256
- [275] Váró, G., Brown, L., Lakatos, M. und Lanyi, J. *Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin*. Biophys. J. (2003) **84**: 1202–1207
- [276] Schäfer, G., Shastri, S., Verhoefen, M.K., Vogel, V., Glaubitz, C., Wachtveitl, J. und Mantele, W. *Characterizing the Structure and Photocycle of PR 2D Crystals with CD and FTIR Spectroscopy* Photochem. Photobiol. (2009) **85**: 529–534
- [277] Lakatos, M. und Váró, G. *The influence of water on the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low and high pH* J. Photochem. Photobiol., B (2004) **73**: 177–182
- [278] Lakatos, M., Lanyi, J., Szakacs, J. und Váró, G. *The photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low pH*. Biophys. J. (2003) **84**: 3252–3256
- [279] Neumann, K., Verhoefen, M.K., Weber, I., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Initial reaction dynamics of proteorhodopsin observed by femtosecond infrared and visible spectroscopy* Biophys. J. (2008) **94**: 4796–4807
- [280] Szakacs, Y., Lakatos, M., Ganea, C. und Váró, G. *Kinetic isotope effects in the photochemical reaction cycle of ion transporting retinal proteins* J. Photochem. Photobiol., B (2005) **79**: 145–150
- [281] Amsden, J.J., Kralj, J.M., Chieffo, L.R., Wang, X.H., Erramilli, S., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Ziegler, L.D. und Rothschild, K.J. *Subpicosecond protein backbone changes detected during the green-absorbing proteorhodopsin primary photoreaction* J. Phys. Chem. B (2007) **111**: 11824–11831
- [282] Lenz, M.O., Woerner, A.C., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Photoisomerization in proteorhodopsin mutant D97N* Photochem. Photobiol. (2007) **83**: 226–231
- [283] Köhler, T. Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (2010)
- [284] Hamm, P., Zurek, M., Röschinger, T., Patzelt, H., Oesterhelt, D.S. und Zinth, W. *Subpicosecond infrared spectroscopy on the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-trans retinal* Chem. Phys. Lett. (1997) **268**: 180–186

- [285] Koller, F.O., Sobotta, C., Schrader, T.E., Cordes, T., Schreier, W.J., Sieg, A. und Gilch, P. *Slower processes of the ultrafast photo-isomerization of an azobenzene observed by IR spectroscopy* Chem. Phys. (2007) **341**: 258–266
- [286] Garczarek, F. und Gerwert, K. *Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy* Nature (2006) **439**: 109–112
- [287] Wörner, A. *Biochemische und Festkörper-NMR spektroskopische Untersuchungen an Proteorhodopsin* Diplomarbeit Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt (2006)
- [288] Doster, W. *The protein-solvent glass transition*. Biochim. Biophys. Acta (2010) **1804**: 3–14
- [289] Heyes, C.D. und El-Sayed, M.A. *Proton transfer reactions in native and deionized bacteriorhodopsin upon delipidation and monomerization*. Biophys. J. (2003) **85**: 426–434
- [290] Heyes, C.D. und El-Sayed, M.A. *The role of the native lipids and lattice structure in bacteriorhodopsin protein conformation and stability as studied by temperature-dependent Fourier transform-infrared spectroscopy*. J. Biol. Chem. (2002) **277**: 29437–29443
- [291] Váró, G. und Lanyi, J.K. *Effects of the crystalline structure of purple membrane on the kinetics and energetics of the bacteriorhodopsin photocycle*. Biochemistry (1991) **30**: 7165–7171
- [292] Váró, G. und Lanyi, J.K. *Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration*. Biophys. J. (1991) **59**: 313–322
- [293] Zscherp, C. und Heberle, J. *pH dependence of proton transfer reactions within bacteriorhodopsin: A time-resolved ATR/FT-IR study* Biophys. J. (1997) **72**: 395–395
- [294] Braiman, M.S., Mogi, T., Marti, T., Stern, L.J., Khorana, H.G. und Rothschild, K.J. *Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants - light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic-acid residue-85, residue-96, and residue-212* Biochemistry (1988) **27**: 8516–8520
- [295] Hessling, B., Souvignier, G. und Gerwert, K. *A model-independent approach to assigning bacteriorhodopsins intramolecular reactions to photocycle intermediates* Biophys. J. (1993) **65**: 1929–1941
- [296] Zscherp, C., Schlesinger, R., Tittor, J., Oesterhelt, D. und Heberle, J. *In situ determination of transient  $pK_a$  changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1999) **96**: 5498–5503

- [297] Heberle, J., Fitter, J., Sass, H.J. und Büldt, G. *Bacteriorhodopsin: the functional details of a molecular machine are being resolved* Biophys. Chem. (2000) **85**: 229–248
- [298] Kandori, H., Yamazaki, Y., Sasaki, J., Needleman, R., Lanyi, J.K. und Maeda, A. *Water-mediated proton transfer in proteins: An FTIR study of bacteriorhodopsin*. J. Am. Chem. Soc. (1995) **117**: 2118–2119
- [299] Nagel, G., Mockel, B., Büldt, G. und Bamberg, E. *Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H<sup>+</sup> pumping* FEBS Lett. (1995) **377**: 263–266
- [300] Ormos, P., Dancshazy, Z. und Keszthelyi, L. *Electric-Response of a Back Photoreaction in the Bacteriorhodopsin Photocycle* Biophys. J. (1980) **31**: 207–213
- [301] Barth, A. *Fine-structure enhancement–assessment of a simple method to resolve overlapping bands in spectra*. Spectrochim. Acta, Part A (2000) **56**: 1223–1232
- [302] Stehfest, K. und Hegemann, P. *Evolution of the Channelrhodopsin Photocycle Model* ChemPhysChem (2010) **11**: 1120–1126
- [303] Ozawa, S.I., Nield, J., Terao, A., Stauber, E.J., Hippler, M., Koike, H., Rochaix, J.D. und Takahashi, Y. *Biochemical and structural studies of the large Ycf4-photosystem I assembly complex of the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell (2009) **21**: 2424–2442
- [304] Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. und Bamberg, E. *Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2003) **100**: 13940–13945
- [305] Berthold, P., Tsunoda, S.P., Ernst, O.P., Mages, W., Gradmann, D. und Hegemann, P. *Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in Chlamydomonas by immediate light-induced depolarization* Plant Cell (2008) **20**: 1665–1677
- [306] Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Mustl, A.M., Bamberg, E. und Hegemann, P. *Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae* Science (2002) **296**: 2395–2398
- [307] Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E. und Hegemann, P. *Vision in single-celled algae* News Physiol. Sci. (2004) **19**: 133–137
- [308] Kirsch, T. *Funktionelle Expression von Channelrhodopsin 2 (ChR2) in der methylo-trophen Hefe Pichia pastoris und biophysikalische Charakterisierung* Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2007)

- [309] Bamann, C., Kirsch, T., Nagel, G. und Bamberg, E. *Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function* J. Mol. Biol. (2008) **375**: 686–694
- [310] Ernst, O.P., Murcia, P.A.S., Daldrop, P., Tsunoda, S.P., Kateriya, S. und Hegemann, P. *Photoactivation of channelrhodopsin* J. Biol. Chem. (2008) **283**: 1637–1643
- [311] Feldbauer, K., Zimmermann, D., Pintschovius, V., Spitz, J., Bamann, C. und Bamberg, E. *Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2009) **106**: 12317–12322
- [312] Nikolic, K., Grossman, N., Grubb, M.S., Burrone, J., Toumazou, C. und Degenaar, P. *Photocycles of Channelrhodopsin-2* Photochem. Photobiol. (2009) **85**: 400–411
- [313] Radu, I., Bamann, C., Nack, M., Nagel, G., Bamberg, E. und Heberle, J. *Conformational Changes of Channelrhodopsin-2* J. Am. Chem. Soc. (2009) **131**: 7313–7319
- [314] Ritter, E., Stehfest, K., Berndt, A., Hegemann, P. und Bartl, F.J. *Monitoring Light-induced Structural Changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier Transform Infrared Spectroscopy* J. Biol. Chem. (2008) **283**: 35033–35041
- [315] Nack, M., Radu, I., Bamann, C., Bamberg, E. und Heberle, J. *The retinal structure of channelrhodopsin-2 assessed by resonance Raman spectroscopy*. FEBS Lett. (2009) **583**: 3676–3680
- [316] Takahashi, T., Yan, B., Mazur, P., Derguini, F., Nakanishi, K. und Spudich, J.L. *Color Regulation in the Archaeobacterial Phototaxis Receptor Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin-I)* Biochemistry (1990) **29**: 8467–8474
- [317] Drachev, L.A., Dracheva, S.V. und Kaulen, A.D. *pH dependence of the formation of an M-type intermediate in the photocycle of 13-cis-bacteriorhodopsin*. FEBS Lett. (1993) **332**: 67–70
- [318] Kalisky, O., Goldschmidt, C.R. und Ottolenghi, M. *On the photocycle and light adaptation of dark-adapted bacteriorhodopsin*. Biophys. J. (1977) **19**: 185–189
- [319] Hofrichter, J., Henry, E.R. und Lozier, R.H. *Photocycles of bacteriorhodopsin in light- and dark-adapted purple membrane studied by time-resolved absorption spectroscopy*. Biophys. J. (1989) **56**: 693–706
- [320] Mizuide, N., Shibata, M., Friedman, N., Sheves, M., Belenky, M., Herzfeld, J. und Kandori, H. *Structural changes in bacteriorhodopsin following retinal photoisomerization from the 13-cis form*. Biochemistry (2006) **45**: 10674–10681
- [321] Kaulen, A.D., Drachev, L.A. und Zorina, V.V. *Proton transport and M-type intermediate formation by 13-cis-bacteriorhodopsin* Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg. (1990) **1018**: 103–113

- [322] Gergely, C., Ganea, C. und Váró, G. *Combined optical and photoelectric study of the photocycle of 13-cis bacteriorhodopsin*. Biophys. J. (1994) **67**: 855–861
- [323] Hegemann, P., Gärtner, W. und Uhl, R. *All-trans retinal constitutes the functional chromophore in Chlamydomonas rhodopsin*. Biophys. J. (1991) **60**: 1477–1489
- [324] Ye, T., Gershgoren, E., Friedman, N., Ottolenghi, M., Sheves, M. und Ruhman, S. *Resolving the primary dynamics of bacteriorhodopsin, and of a 'C-13=C-14 locked' analog, in the reactive excited state* Chem. Phys. Lett. (1999) **314**: 429–434
- [325] Haran, G., Wynne, K., Xie, A.H., He, Q., Chance, M. und Hochstrasser, R.M. *Excited state dynamics of bacteriorhodopsin revealed by transient stimulated emission spectra* Chem. Phys. Lett. (1996) **261**: 389–395
- [326] Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Govindjee, R. und Ebrey, T.G. *Quantum Yield Ratio of the Forward and Back Light Reactions of Bacteriorhodopsin at Low-Temperature and Photosteady-State Concentration of the Bathoproduct-K* Photochem. Photobiol. (1991) **54**: 955–961
- [327] Tittor, J. und Oesterhelt, D. *The Quantum Yield Of Bacteriorhodopsin* FEBS Lett. (1990) **263**: 269–273
- [328] Rohr, M., Gärtner, W., Schweitzer, G., Holzwarth, A.R. und Braslavsky, S.E. *Quantum Yields Of The Photochromic Equilibrium Between Bacteriorhodopsin And Its Bathointermediate-K - Femtosecond And Nanosecond Optoacoustic Spectroscopy* J. Phys. Chem. (1992) **96**: 6055–6061
- [329] Song, L., A., E.S.M. und Lanyi, J.K. *Protein Catalysis of the Retinal Subpicosecond Photoisomerisation in the Primary Process of Bacteriorhodopsin Photosynthesis* Science (1993) **261**: 891–894
- [330] Verhoeven, M.K., Lenz, M.O., Amarie, S., Klare, J.P., Tittor, J., Oesterhelt, D., Engelhard, M. und Wachtveitl, J. *Primary reaction of sensory rhodopsin II mutant D75N and the influence of azide*. Biochemistry (2009) **48**: 9677–9683
- [331] Bamann, C., Gueta, R., Kleinlogel, S., Nagel, G. und Bamberg, E. *Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond*. Biochemistry (2010) **49**: 267–278
- [332] Nack, M., Radu, I., Gossing, M., Bamann, C., Bamberg, E., von Mollard, G.F. und Heberle, J. *The DC gate in Channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156*. Photochem. Photobiol. Sci. (2010) **9**: 194–198
- [333] Stehfest, K., Ritter, E., Berndt, A., Bartl, F. und Hegemann, P. *The Branched Photocycle of the Slow-Cycling Channelrhodopsin-2 Mutant C128T*. J. Mol. Biol. (2010) **398**: 690–702

- [334] Chizhov, I., Chernavskii, D.S., Engelhard, M., Mueller, K.H., Zubov, B.V. und Hess, B. *Spectrally silent transitions in the bacteriorhodopsin photocycle* Biophys. J. (1996) **71**: 2329–2345
- [335] Váró, G. und Lanyi, J.K. *Thermodynamics and Energy Coupling in the Bacteriorhodopsin Photocycle* Biochemistry (1991) **30**: 5016–5022
- [336] Le Coutre, J., Tittor, J., Oesterhelt, D. und Gerwert, K. *Experimental evidence for hydrogen-bonded network proton-transfer in bacteriorhodopsin shown by fourier-transform infrared-spectroscopy using azide as catalyst* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1995) **92**: 4962–4966
- [337] Steinhoff, H.J., Pfeiffer, M., Rink, T., Burlon, O., Kurz, M., Riesle, J., Heuberger, E., Gerwert, K. und Oesterhelt, D. *Azide reduces the hydrophobic barrier of the bacteriorhodopsin proton channel* Biophys. J. (1999) **76**: 2702–2710
- [338] Tittor, J., Bamberg, E. und Oesterhelt, D. *The Mode of Action of Azide in Bacteriorhodopsin if Asp96 is lacking* FASEB J. (1992) **6**: 531–531
- [339] Tittor, J., Schweiger, U., Oesterhelt, D. und Bamberg, E. *Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N* Biophys. J. (1994) **67**: 1682–1690
- [340] Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., Butt, H.J. und Bamberg, E. *A Defective Proton Pump, Point-Mutated Bacteriorhodopsin Asp96Asn Is Fully Reactivated by Azide* EMBO J. (1989) **8**: 3477–3482
- [341] Tittor, J., Wahl, M., Schweiger, U. und Oesterhelt, D. *Specific acceleration of deprotonation and reprotonation steps by azide in mutated bacteriorhodopsins* Biochim. Biophys. Acta (1994) **1187**: 191–197
- [342] Schmies, G., Luttenberg, B., Chizhov, I., Engelhard, M., Becker, A. und Bamberg, E. *Sensory rhodopsin II from the haloalkaliphilic Natronobacterium pharaonis: Light-activated proton transfer reactions* Biophys. J. (2000) **78**: 967–976
- [343] Zhang, X.N. und Spudich, J.L. *His166 is critical for active-site proton transfer and phototaxis signaling by sensory rhodopsin I* Biophys. J. (1997) **73**: 1516–1523
- [344] Lakatos, M., Groma, G.I., Ganea, C., Lanyi, J.K. und Váró, G. *Characterization of the azide-dependent bacteriorhodopsin-like photocycle of salinarum halorhodopsin* Biophys. J. (2002) **82**: 1687–1695
- [345] Takao, K., Kikukawa, T., Arais, T. und Kamo, N. *Azide accelerates the decay of M-intermediate of pharaonis phoborhodopsin* Biophys. Chem. (1998) **73**: 145–153
- [346] Blanchard, D., Gilmore, D.A., Brack, T.L., Lemaire, H., Hughes, D. und Atkinson, G.H. *Picosecond Time-Resolved Absorption and Fluorescence in the Bacteriorhodopsin Photocycle - Vibrationally-Excited Species* Chem. Phys. (1991) **154**: 155–170

- [347] Heyne, K., Herbst, J., Dominguez-Herradon, B., Alexiev, U. und Diller, R. *Reaction control in bacteriorhodopsin: Impact of arg82 and asp85 on the fast retinal isomerization, studied in the second site revertant arg82ala / gly231cys and various purple and blue forms of bacteriorhodopsin* J. Phys. Chem. B (2000) **104**: 6053–6058
- [348] Schenkl, S., van Mourik, F., Friedman, N., Sheves, M., Schlesinger, R., Haacke, S. und Chergui, M. *Insights into excited-state and isomerization dynamics of bacteriorhodopsin from ultrafast transient UV absorption* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2006) **103**: 4101–4106
- [349] Wang, J.P., Link, S., Heyes, C.D. und El-Sayed, M.A. *Comparison of the dynamics of the primary events of bacteriorhodopsin in its trimeric and monomeric states* Biophys. J. (2002) **83**: 1557–1566
- [350] Spudich, J.L. *Color sensing in the archaea - a eukaryotic-like receptor-coupled to a prokaryotic transducer* J. Bacteriol. (1993) **175**: 7755–7761
- [351] Scherrer, P., McGinnis, K. und Bogomolni, R.A. *Biochemical And Spectroscopic Characterization Of The Blue-Green Photoreceptor In Halobacterium-Halobium* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1987) **84**: 402–406
- [352] Spudich, J.L. und Luecke, H. *Sensory rhodopsin II: functional insights from structure* Curr. Opin. Struct. Biol. (2002) **12**: 540–546
- [353] Sudo, Y., Furutani, Y., Shimono, K., Kamo, N. und Kandori, H. *Hydrogen bonding alteration of Thr-204 in the complex between pharaonis phoborhodopsin and its transducer protein.* Biochemistry (2003) **42**: 14166–14172
- [354] Gordeliy, V.I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A.J., Klare, J.P. und Engelhard, M. *Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex.* Nature (2002) **419**: 484–487
- [355] Moukhametzianov, R., Klare, J.P., Efremov, R., Baeken, C., Goppner, A., Labahn, J., Engelhard, M., Büldt, G. und Gordeliy, V.I. *Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer* Nature (2006) **440**: 115–119
- [356] Sudo, Y., Furutani, Y., Kandori, H. und Spudich, J.L. *Functional importance of the interhelical hydrogen bond between Thr204 and Tyr174 of sensory rhodopsin II and its alteration during the signaling process.* J. Biol. Chem. (2006) **281**: 34239–34245
- [357] Sudo, Y., Okuda, H., Yamabi, M., Fukuzaki, Y., Mishima, M., Kamo, N. und Kojima, C. *Linker region of a halobacterial transducer protein interacts directly with its sensor retinal protein.* Biochemistry (2005) **44**: 6144–6152

- [358] Sudo, Y., Yamabi, M., Iwamoto, M., Shimono, K. und Kamo, N. *Interaction of Natronobacterium pharaonis phoborhodopsin (sensory rhodopsin II) with its cognate transducer probed by increase in the thermal stability*. Photochem. Photobiol. (2003) **78**: 511–516
- [359] Sudo, Y., Yamabi, M., Kato, S., Hasegawa, C., Iwamoto, M., Shimono, K. und Kamo, N. *Importance of specific hydrogen bonds of archaeal rhodopsins for the binding to the transducer protein*. J. Mol. Biol. (2006) **357**: 1274–1282
- [360] Furutani, Y., Ito, M., Sudo, Y., Kamo, N. und Kandori, H. *Protein-protein interaction of a Pharaonis halorhodopsin mutant forming a complex with Pharaonis halobacterial transducer protein II detected by Fourier-transform infrared spectroscopy*. Photochem. Photobiol. (2008) **84**: 874–879
- [361] Hippler-Mreyen, S., Klare, J.P., Wegener, A.A., Seidel, R., Herrmann, C., Schmies, G., Nagel, G., Bamberg, E. und Engelhard, M. *Probing the sensory rhodopsin II binding domain of its cognate transducer by calorimetry and electrophysiology*. J. Mol. Biol. (2003) **330**: 1203–1213
- [362] Etzkorn, M., Seidel, K., Li, L., Martell, S., Geyer, M., Engelhard, M. und Baldus, M. *Complex Formation and Light Activation in Membrane-Embedded Sensory Rhodopsin II as Seen by Solid-State NMR Spectroscopy* Structure (2010) **18**: 293–300
- [363] Wegener, A.A., Chizhov, I., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. *Time-resolved detection of transient movement of helix F in spin-labelled pharaonis sensory rhodopsin II*. J. Mol. Biol. (2000) **301**: 881–891
- [364] Yang, C.S., Sineshchekov, O., Spudich, E.N. und Spudich, J.L. *The cytoplasmic membrane-proximal domain of the HtrII transducer interacts with the E-F loop of photoactivated Natronomonas pharaonis sensory rhodopsin II* J. Biol. Chem. (2004) **279**: 42970–42976
- [365] Rudolph, J. und Oesterhelt, D. *Deletion analysis of the che operon in the archaeon Halobacterium salinarium*. J. Mol. Biol. (1996) **258**: 548–554
- [366] Rudolph, J. und Oesterhelt, D. *Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon Halobacterium salinarium*. EMBO J. (1995) **14**: 667–673
- [367] Klare, J.P., Gordeliy, V.I., Labahn, J., Buldt, G., Steinhoff, H.J. und Engelhard, M. *The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer* FEBS Lett. (2004) **564**: 219–224
- [368] Klare, J.P., Bordignon, E., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. *Sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin: Light activated helix F movement* Photochem. Photobiol. Sci. (2004) **3**: 543–547

- [369] Bordignon, E., Klare, J.P., Doebber, M., Wegener, A.A., Martell, S., Engelhard, M. und Steinhoff, H.J. *Structural analysis of a HAMP domain: the linker region of the phototransducer in complex with sensory rhodopsin II*. J. Biol. Chem. (2005) **280**: 38767–38775
- [370] Kamada, K., Furutani, Y., Sudo, Y., Kamo, N. und Kandori, H. *Temperature-dependent interactions between photoactivated pharaonis phoborhodopsin and its transducer*. Biochemistry (2006) **45**: 4859–4866
- [371] Inoue, K., Sasaki, J., Spudich, J.L. und Terazima, M. *Signal transmission through the HtrII transducer alters the interaction of two alpha-helices in the HAMP domain*. J. Mol. Biol. (2008) **376**: 963–970
- [372] Peters, F., Herbst, J., Tittor, J., Oesterhelt, D. und Diller, R. *Primary reaction dynamics of halorhodopsin, observed by sub-picosecond IR - vibrational spectroscopy*. Chem. Phys. (2006) **323**: 109–116
- [373] Polland, H.J., Franz, M.A., Zinth, W., Kaiser, W., Hegemann, P. und Oesterhelt, D. *Picosecond events in the photochemical cycle of the light-driven chloride-pump halorhodopsin*. Biophys. J. (1985) **47**: 55–59
- [374] Arlt, T., Schmidt, S., Zinth, W., Haupts, U. und Oesterhelt, D. *The Initial Reaction Dynamics of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin*. Chem. Phys. Lett. (1995) **241**: 559–565
- [375] Sobotta, C., Braun, M., Tittor, J., Oesterhelt, D. und Zinth, W. *Influence of the charge at D85 on the initial steps in the photocycle of bacteriorhodopsin*. Biophys. J. (2009) **97**: 267–276
- [376] Tittor, J., Oesterhelt, D., Maurer, R., Desel, H. und Uhl, R. *The Photochemical Cycle of Halorhodopsin: Absolute Spectra of Intermediates Obtained by Flash Photolysis and Fast Difference Spectra Measurements*. Biophys. J. (1987) **52**: 999–1006
- [377] Chizhov, I., Schmies, G., Seidel, R., Sydor, J.R., Lüttenberg, B. und Engelhard, M. *The photophobic receptor from Natronobacterium pharaonis: temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II*. Biophys. J. (1998) **75**: 999–1009
- [378] Losi, A., Braslavsky, S.E., Gärtner, W. und Spudich, J.L. *Time-resolved absorption and photothermal measurements with sensory rhodopsin I from Halobacterium salinarum*. Biophys. J. (1999) **76**: 2183–2191
- [379] Mogi, T., Stern, L.J., Marti, T., Chao, B.H. und Khorana, H.G. *Structure-Function Studies on Bacteriorhodopsin. Aspartic-Acid Substitutions Affect Proton Translocation by Bacteriorhodopsin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) **85**: 4148–4152

- [380] Subramaniam, S., Greenhalgh, D.A. und Khorana, H.G. *Aspartic Acid-85 in Bacteriorhodopsin Functions Both as Proton Acceptor and Negative Counterion to the Schiff-Base* J. Biol. Chem. (1992) **267**: 25730–25733
- [381] Thorgeirsson, T.E., Milder, S.J., Miercke, L.J., Betlach, M.C., Shand, R.F., Stroud, R.M. und Kliger, D.S. *Effects of Asp-96-Asn, Asp-85-Asn, and Arg-82-Gln single-site substitutions on the photocycle of bacteriorhodopsin*. Biochemistry (1991) **30**: 9133–9142
- [382] Turner, G.J., Miercke, L.J., Thorgeirsson, T.E., Kliger, D.S., Betlach, M.C. und Stroud, R.M. *Bacteriorhodopsin D85N: three spectroscopic species in equilibrium*. Biochemistry (1993) **32**: 1332–1337
- [383] Losi, A., Wegener, A.A., Engelhard, M., Gärtner, W. und Braslavsky, S.E. *Aspartate 75 mutation in sensory rhodopsin II from Natronobacterium pharaonis does not influence the production of the K-like intermediate, but strongly affects its relaxation pathway* Biophys. J. (2000) **78**: 2581–2589
- [384] Inoue, K., Sasaki, J., Spudich, J.L. und Terazima, M. *Laser-induced transient grating analysis of dynamics of interaction between sensory rhodopsin II D75N and the HtrII transducer* Biophys. J. (2007) **92**: 2028–2040
- [385] Sasaki, J. und Spudich, J.L. *Signal transfer in haloarchaeal sensory rhodopsin-transducer complexes* Photochem. Photobiol. (2008) **84**: 863–868
- [386] Verhoefen, M.K. *Kurzzeitspektroskopische Charakterisierung eines spezifisch mutierten sensorischen Rhodopsins* Diplomarbeit Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (2005)
- [387] Hohenfeld, I.P., Wegener, A.A. und Engelhard, M. *Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in Escherichia coli* FEBS Lett. (1999) **442**: 198–202
- [388] El-Sayed, M.A., Griffiths, J., Song, L. und Zhang, N. *On the molecular mechanisms of the rapid and slow solar-to-electric energy-storage processes by the other natural photosynthetic system, bacteriorhodopsin* Pure Appl. Chem. (1995) **67**: 149–155
- [389] Verhoefen, M.K., Neumann, K., Weber, I., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Primary Reaction Dynamics of Proteorhodopsin Mutant D97N Observed by Femtosecond Infrared and Visible Spectroscopy* Photochem. Photobiol. (2009) **85**: 540–546
- [390] Nonella, M. *Electrostatic protein-chromophore interactions promote the all-trans to 13-cis isomerization of the protonated retinal Schiff base in bacteriorhodopsin: An ab initio CASSCF/MRCI study* J. Phys. Chem. B (2000) **104**: 11379–11388
- [391] Zinth, W., Sieg, A., Huppmann, P., Blankenhorn, T., Oesterheld, D. und Nonella, M. *Femtosecond spectroscopy and model calculations for an understanding of the primary reaction in bacteriorhodopsin* Ultrafast Phenomena XII (2001) **66**: 680–682

- [392] Hein, M., Radu, I., Klare, J.P., Engelhard, M. und Siebert, F. *Consequences of counterion mutation in sensory rhodopsin II of Natronobacterium pharaonis for photoreaction and receptor activation: An FTIR study* Biochemistry (2004) **43**: 995–1002
- [393] Sudo, Y. und Spudich, J.L. *Three strategically placed hydrogen-bonding residues convert a proton pump into a sensory receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2006) **103**: 16129–16134
- [394] Klare, J.P., Bordignon, E., Doebber, M., Fitter, J., Kriegsmann, J., Chizhov, I., Steinhoff, H.J. und Engelhard, M. *Effects of solubilization on the structure and function of the sensory rhodopsin II/transducer complex* J. Mol. Biol. (2006) **356**: 1207–1221
- [395] Sasaki, J. und Spudich, J.L. *The transducer protein HtrII modulates the lifetimes of sensory rhodopsin II photointermediates.* Biophys. J. (1998) **75**: 2435–2440
- [396] Lutz, I. *Vielkanal-Femtosekunden-Spektroskopie der Primärreaktionen von archaeobakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich* Dissertation Ludwigs-Maximilians-Universität München (2001)
- [397] Diller, R., Jakober, R., Schumann, C., Peters, F., Klare, J.P. und Engelhard, M. *The trans-cis isomerization reaction dynamics in sensory rhodopsin II by femtosecond time-resolved midinfrared spectroscopy: Chromophore and protein dynamics* Biopolymers (2006) **82**: 358–362
- [398] Gross, R., Wolf, M.M.N., Schumann, C., Friedman, N., Sheves, M., Li, L., Engelhard, M., Trentmann, O., Neuhaus, H.E. und Diller, R. *Primary photoinduced protein response in bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin II.* J. Am. Chem. Soc. (2009) **131**: 14868–14878
- [399] Haran, G., Morlino, E.A., Matthes, J., Callender, R.H. und Hochstrasser, R.M. *Femtosecond Polarized Pump-Probe and Stimulated Emission Spectroscopy of the Isomerization Reaction of Rhodopsin* J. Phys. Chem. A (1999) **103**: 2202–2207

# Danksagung

*Die besten Dinge im Leben sind nicht  
die, die man für Geld bekommt.*

—————  
*Albert Einstein*

Zu aller erst danke ich meinem Chef, Prof. Josef Wachtveitl, für die Vergabe des interessanten Themas, das in mich gesetzte Vertrauen und die Freiheiten, die ich über die Jahre genießen durfte.

Prof. Clemens Glaubitz und seiner PR-Community (Dr. Lubica Aslimovska, Nicole Pfleger, Dr. Sarika Shastri, Ingrid Weber, Andreas Woerner sowie die nachfolgende Diplomandenriege) danke ich sehr für die stete Diskussionsbereitschaft und die enormen Proteinmengen, die ich über die Jahre bekommen habe. Eine bessere Kooperation kann ich mir nur schwer vorstellen.

Auch die Zusammenarbeit mit Prof. Ernst Bamberg und Dr. Christian Bamann auf dem Gebiet von ChR-2 war sehr fruchtbar. Für die wertvollen Beiträge zu diesem Projekt danke ich zudem Rene Blöcher, Ute Förster und Frank Scholz.

Bei Prof. Martin Engelhard, Dr. Johann Klare und Annika Göppner möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung der Sensorrhodopsin-Proben bedanken.

Prof. Dieter Oesterhelt und Dr. Jörg Tittor danke ich für die Bakteriorhodopsin-Proben und die telefonischen Diskussionsrunden.

Prof. Werner Mäntele und insbesondere Dr. Gabriela Schäfer gilt meine herzlicher Dank für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Tieftemperatur-IR-Spektroskopie. Gabi, du bist mir wirklich eine sehr gute Freundin geworden.

Für das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Dr. Markus Braun, Nina Gildenhoff, Julia Herz, Karsten Neumann, Frank Scholz, Dr. Brian Schwarz-Verhoefen, Heike Staudt und Dr. Peter Pickel.

Viele Messungen wären ohne die Sonderanfertigungen aus den Feinmechanik-Werkstätten nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich daher herzlich bei der Truppe um Herrn Jäger und Herrn Ott sowie bei Ernst Winter.

Für die Erledigung all der administrativen Kleinigkeiten danke ich Frau von Sulecki, Frau Grönitz, Frau U. Lorenz und Frau Lill.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Karsten Neumann. Was hätte ich nur all die Jahre ohne dich gemacht? Du hast jede meiner Fragen mit unendlich viel Ruhe und Geduld beantwortet und hast mir alle physikalisch-technischen Kniffe beigebracht, die ich brauchte. In der Arbeit wie auch im Privatleben warst du es, der mir gezeigt hat, dass  $1 + 1$  in manchen Fällen auch größer als 2 sein kann. Danke, dass ich dich ausgraben durfte.

Bei Heike Staudt und Julia Herz bedanke ich mich für die wunderbare Büro-Ehe. Wohnst du noch, oder lebst du schon??

Die Freundschaft zu Kathrin "Frau Dröge" Dörr hat mir während dieser Arbeit so manche Stunde versüßt. Kathrin, ich bin sehr froh, dass es dich gibt.

Nicht zu vernachlässigen beim Entstehen dieser Arbeit waren die unzähligen Kaffeerunden im Kreise vieler ehemaliger und jetziger Gruppenmitglieder der Arbeitsgruppen Wachtveitl, Stock, Dreuw und Mäntele. Um nur die wichtigsten zu nennen Martin, Karsten, Thomas, Peter P., Lisa, Ute, Heike, Nina, Lars, Julia, Markus, Frank, Peter T., Jörg, Elena, Rainer, Maja, Andreas, Michael, Jan-Hendrik, Jürgen, Philipp, Stefan, Dirk, Carsten, Gabi, Georg, ... und alle, die ich vergessen habe.

Ein spezieller Dank geht natürlich an die "Mädels": Heike, Julia, Gabi, Ute, Lisa, Nina und Kathrin. Ihr habt auch in schwierigen Zeiten stets zu mir gestanden und ich konnte mich immer voll und ganz auf euch verlassen. Tausend Dank!

Für die inspirierenden Praktikumsdienste, in denen ich viel gelernt und gelacht habe, möchte ich mich herzlich bei Dr. Dominik Margraf bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken: Meinen Eltern für die finanzielle und emotionale Unterstützung über die Jahre - euer Stolz hat mich immer angetrieben. Meiner Schwester Ninja und meinem Bruder Niklas dafür, dass sie mich immer wieder in die reale Welt zurück geholt haben. Meinem neuen "großen Bruder" Dr. Brian Schwarz-Verhoefen danke ich für die großartige Unterstützung und das über die Jahre aufgebrachte Verständnis, speziell wenn es abends wieder mal später als spät wurde oder zu Zeiten, in denen mein Büro in der Woche mein Wohnzimmer und unser Wohnzimmer am Wochenende mein Arbeitszimmer war.





# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

Name Mirka-Kristin Verhoefen  
Geburtsdatum / -ort 11.02.1981, Duisburg  
Familienstand geschieden

## SCHULAU SBILDUNG

08 / 1987 – 07 / 1991 Anton-Calaminus-Grund- und Hauptschule, Gründau  
08 / 1991 – 07 / 2000 Grimmelshausen Gymnasium, Gelnhausen  
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

## UNIVERSITÄRER WERDEGANG

10 / 2000 – 09 / 2005 Studium Diplom Chemie mit Nebenfach Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Gesamturteil: sehr gut  
10 / 2002 Vorexamen im Fach Diplom Chemie, Gesamturteil: gut  
1 / 2005 – 8 / 2005 Diplomarbeit am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Wachtveitl zum Thema „Kurzeitspektroskopische Charakterisierung eines spezifisch mutierten sensorischen Rhodopsins“  
Beurteilung: sehr gut  
Seit 10 / 2005 Promotion an der Johann Wolfgang Goethe-Universität im Institut für Physikalische und Theoretische Chemie bei Prof. Dr. J. Wachtveitl  
„Funktionelle Dynamik des Retinalchromophors in verschiedenen Rhodopsinen“