

**Femtosekunden zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie  
zur vergleichenden Untersuchung  
von trans-cis-Isomerisierungs-Reaktionen in  
Halorhodopsin und Bakteriorhodopsin**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
am Fachbereich Physik  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Frank Peters

Berlin, 2005



1. Gutachter: Professor R. Diller
2. Gutachter: Professor N. Schwentner

Disputationstermin: 25.04.2005



## 0 Kurzfassung

Die photoinduzierte Primärreaktion der Retinalproteine Halorhodopsin (HR) und Bakteriorhodopsin (bR), die mit einer all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors um dessen C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung verbunden ist (*HR*<sub>600</sub> – bzw. *bR*<sub>K</sub>- Produktentstehung), wurde mit transientser IR-Schwingungsspektroskopie bei einer Zeitauflösung von ca. 240 fs und einer spektralen Auflösung von 3 cm<sup>-1</sup> bis 5 cm<sup>-1</sup> und mit optischer Spektroskopie untersucht. Die Messungen mit optischer fs-Spektroskopie zeigen, dass die Primärreaktion von HR durch die drei Zeitkonstanten 6.6(8) ps, 1.5(3) ps und 0.3(1) ps bestimmt ist; der Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes S<sub>1</sub> hat dabei eine Dynamik, die durch die ersten beiden Zeitkonstanten charakterisiert ist. Die S<sub>1</sub>-Dynamik von bR läuft dagegen nur mit einer Zeitkonstante von ~ 0.5 ps ab [Herbst2002/I][Herbst2002/II]. Da der Ausgangszustand des HR heterogen ist (~ 83 % Spezies mit all-trans- und ~ 17 % mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration des Retinalchromophors), stellt sich die Frage, ob jeweils einer Spezies eine Zeitkonstante zugeordnet ist, oder ob beide Zeitkonstanten von der Dynamik nur einer Spezies stammen. Eine weitere Frage ist die Zuordnung einer Zeitkonstante zur *HR*<sub>600</sub> -Produktentstehung. Wir haben daher zum ersten Mal transiente IR-Schwingungsspektroskopie an hydratisierten HR-Filmen durchgeführt, mit dem Vorteil gegenüber der optischen fs-Spektroskopie der spektral schmalen und mannigfaltigen IR-Banden, an denen sich direkt die strukturelle Dynamik beobachten lässt. An der zeitlichen Entwicklung der Markerbanden (C-C-Streckschwingungen: 1135 cm<sup>-1</sup> - 1230 cm<sup>-1</sup>) für einen Chromophor, der in 13-cis-Konfiguration vorliegt, zeigte sich, dass die *HR*<sub>600</sub> -Entstehung mit der Zeitkonstante 1.8(1) ps geschieht. Im Bereich der C=C-Streckschwingungen entstanden *HR*<sub>600</sub> -Produktbanden mit 2.2(1) ps. Die Wiederkehr des Ausgangszustandes ist durch die lange Zeitkonstante 7.7(5) ps aber auch durch Anteile an der 2.0(1) ps-Konstante (gemittelte Werte) bestimmt. Diese Zeiten sind mit denen aus den optischen Messungen als konsistent zu betrachten. Bei Variation der Anregungswellenlänge zeigte sich, dass die zwei Zeitkonstanten 2 ps und 7.7 ps nur zur all-trans-Spezies des Ausgangszustandes gehören.

Die Dynamik der Proteinumgebung im Amid-II-Bereich um 1552 cm<sup>-1</sup> zeigt ein mit 2.6(9) ps verzögertes Bleichsignal, das mit 13(5) ps zerfällt (HR). Interessant ist, dass sowohl beim HR als auch beim bR die Entstehungszeit der Bleichbande um 1552 cm<sup>-1</sup> mit der Zerfallszeit des S<sub>1</sub> (bR) bzw. der reaktiven Spezies im S<sub>1</sub> (HR) übereinstimmt. Das weist auf eine durch die Isomerisierung bewirkte sterische

Wechselwirkung des Chromophors mit der Proteinumgebung hin. Ein weiterer Grund für den verzögerten Anstieg kann sein, dass das durch den Pumpimpuls induzierte Dipolfeld zu einer modifizierten Ladungsverteilung in der Nähe des Chromophors führt. Dadurch ändern sich Schwingungsübergänge von geladenen Aminosäuren, der Schiffsbasis oder  $\text{H}_2\text{O}$ . Eine anfängliche Verdrillung des Retinalchromophors ist eine andere Erklärung.

Weiterführende Messungen an bR zeigten, dass die breite HOOP-Differenzbande um  $963\text{ cm}^{-1}$  (Verdrillungsdynamik des Chromophors) mit  $0.6(1)\text{ ps}$  entsteht, was die Ergebnisse von Herbst et al. eines vollständig isomerisierten Chromophors bereits im J-Zustand bestätigt [Herbst2002/I][Herbst2002/II]. Die HOOP-Bande zerfällt mit  $25(17)\text{ ps}$ . Die Ähnlichkeit zur Proteindynamik weist auf eine Wechselwirkung zwischen Verdrillung und dem Protein hin.

Eine dynamische Wechselwirkung des Chromophors mit der Proteinumgebung zeigt sich um  $1649\text{ cm}^{-1}$ . Bei  $\text{H}_2\text{O}$ -bR liegt an dieser Position eine Bleichbande zu späten Zeiten, beim  $\text{D}_2\text{O}$ -bR nicht. Eine Erklärung ist, dass beim  $\text{H}_2\text{O}$ -bR durch die 13-cis-Isomerisierung ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül aus der Nähe der Chromophor-Bindungsstelle in eine andere elektrostatische Umgebung verschoben wird, so dass sich die Frequenz seiner Biegeschwingung ( $1649\text{ cm}^{-1}$ ) verändert.

An den Farbstoffen p-DPD-b13 und DASPI wurden Messungen mit fs IR-Schwingungsspektroskopie durchgeführt. Die polymethinische Theorie sagt einen stufenlosen Übergang von Doppel- zu Einfachbindungen nach Photoanregung und durch das substituenten-induzierte Feld voraus. Bei einem hohen Feld verschiebt sich beim Übergang  $S_0 \rightarrow S_1$  die Frequenz der C=C-Streckschwingung zu höheren Wellenzahlen, was auf einen stärkeren Doppelbindungscharakter im  $S_1$  für die zentrale Bindung schließen lässt. Für DASPI lag die Verschiebung bei  $+13(2)\text{ cm}^{-1}$  (theoretischer Wert  $+11\text{ cm}^{-1}$ ). Überträgt man die Ergebnisse auf andere Farbstoffe wie z. B. HR oder bR, so ist ein Erklärungsansatz für die Frage gefunden, ob neben der  $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ -Doppelbindung auch Einfachbindungen bei der 13-cis-Isomerisierung eine Rolle spielen [Liu1985][Liu2000][Liu2001]. Auch stellen die Ergebnisse eine Basis dar, die Frequenz der C=C-Streckschwingung im  $S_1$  und den Opsinshift zu berechnen [Sczapan2003].

Erste, aussichtsreiche Experimente mit fs IR-Schwingungsspektroskopie wurden an Sensorrhodopsin II durchgeführt. Man kann hierbei die Photoreaktion eines Retinalchromophors in einer etwas anderen Proteinumgebung untersuchen.

## Liste der Abkürzungen

ADC	Analog-Digital-Converter
BBO	beta-Bariumborat
bR	Bakteriorhodopsin
BP	Bifurcation Point
CI	Conical Intersection
CL	Cyanin-Limit
CPA	Chirped Pulse Amplification
DFG	Difference Frequency Generation
FC	Franck-Condon-Zustand
FIZ	Freier Induktionszerfall
FTIR	Fourier Transform Infrared
GF	Global Fit
HOOP	hydrogen-out-of-plane
HR	Halorhodopsin
IR	infrarotes Licht
MCT	Mercury-Cadmium-Tellurid
MEP	Minimal Energy Pathway
NOPA	Non collinear Optical Parametric Amplifier
OD	Optische Dichte
OPA	Optical Parametric Amplification
pHR	Halorhodopsin aus dem Halobakterium Pharaonis
pHtr-II	Transducer des Sensorrhodopsins II aus Halobakterium Pharaonis
PSBR	Protonated Schiff Base Retinal
RR	Resonance Raman
SFG	Sum Frequency Generation
SHG	Second Harmonic Generation
sHR	Halorhodopsin aus dem Halobakterium Salinarum
SPM	Selbstphasenmodulation
SR	Sensorrhodopsin
SVD	Singular Value Decomposition
TP	Twisting Point
VIS	Licht im sichtbaren Spektralbereich
XPM	Cross-phase-modulation (Kreuzphasenmodulation)

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>0 Kurzfassung</u></b> .....	<b>V</b>
<b><u>Liste der Abkürzungen</u></b> .....	<b>VII</b>
<b><u>1 Einleitung/Zielsetzung</u></b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Ablauf der photoinduzierten Primärreaktion der Chloridionenpumpe Halorhodopsin (HR)</i> .....	5
1.2 <i>Ablauf der photoinduzierten Primärreaktion der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (bR)</i> .....	11
1.3 <i>Sensorrhodopsin</i> .....	12
1.4 <i>Ultraschnelle photoinduzierte Dynamik der Farbstoffe p-DPD-b13 und DASPI</i> .....	14
<b><u>2 Theoretische Grundlagen</u></b> .....	<b>17</b>
2.1 <i>Prinzip der Pump-Probe-Spektroskopie</i> .....	17
2.1.1 <i>Absorptionsänderung nach Photoanregung</i> .....	17
2.1.2 <i>Schwingungsmoden von Molekülen</i> .....	21
2.1.3 <i>Franck-Condon-Prinzip</i> .....	22
2.1.4 <i>Freier Induktionszerfall (FIZ)</i> .....	25
2.2 <i>Optisch nichtlineare Methoden und Effekte</i> .....	28
2.2.1 <i>Erzeugung der Summenfrequenz (SFG) und der Differenzfrequenz (DFG)</i> .....	28
2.2.2 <i>Nicht kollineare optisch parametrische Verstärkung: NOPA</i> .....	31
2.2.3 <i>Selbstphasenmodulation (SPM) : Weißlichterzeugung</i> .....	34
2.2.4 <i>Kreuzphasenmodulation (XPM)</i> .....	35
2.3 <i>Polymethinische Theorie</i> .....	37
<b><u>3 Messapparatur</u></b> .....	<b>42</b>
3.1 <i>VIS-IR-Spektrometer</i> .....	43
3.1.1 <i>Pumplichterzeugung: NOPA</i> .....	44
3.1.2 <i>Probelichterzeugung: Infrarot</i> .....	47
3.1.3 <i>Überlagerung von Pump- und Probepuls auf der Probe</i> .....	49
3.2 <i>Aufnahme der Messdaten</i> .....	55



3.3	<i>Präparation, Charakterisierung und Verwendung der Proben</i> .....	57
3.3.1	HR-Filme und bR-Filme.....	57
3.3.2	HR- und bR-D <sub>2</sub> O-Filme.....	62
3.3.3	Farbstoffe DASPI und p-DPD-b13.....	62
3.3.4	Probenverwendung im Experiment.....	63
<b>4</b>	<b><u>Ergebnisse und Diskussion</u></b> .....	<b>65</b>
4.1	<i>Halorhodopsin</i> .....	65
4.1.1	Vergleichbarkeit von HR-Filmen und HR-Suspensionen.....	65
4.1.1.1	VIS-VIS-Spektroskopie an HR-Filmen.....	66
4.1.2	Photoinduzierte Primärreaktion von HR-Filmen untersucht durch fs-VIS-IR Spektroskopie.....	68
4.1.2.1	Übersichtsspektren von 950 cm <sup>-1</sup> bis 1784 cm <sup>-1</sup> .....	68
4.1.2.2	Zuordnung der Schwingungsbanden: Isomerisierung, Dynamik des elektronisch angeregten Zustandes und Proteindynamik.....	70
4.1.2.3	Analyse der Transienten mittels Global Fit und Singular Value Decomposition (SVD).....	79
4.1.2.4	Dynamik im spektralen Bereich der C-C-Streckschwingungen, C=C- Streckschwingung und C=ND-Streckschwingung.....	85
4.1.2.5	Modell zur Primärreaktion.....	109
4.1.3	Einfluss der (13-cis, 15-syn) Grundzustands-Spezies HR <sub>558</sub> („13-cis Zyklus“)...	118
4.1.3.1	Anregungsspektren (VIS-IR) zwischen 480 nm und 660 nm.....	121
4.1.3.2	Dynamik im Fingerprint- und Ethylenbereich bei verschiedenen Anregungswellenlängen.....	126
4.1.3.3	VIS-VIS-Messungen bei verschiedenen Anregungswellenlängen.....	131
4.2	<i>Bakteriorhodopsin</i> .....	135
4.2.1	Verdrillung des Retinalchromophors: „hydrogen-out-of-plane“-Schwingungen...	135
4.2.2	Mit D <sub>2</sub> O modifiziertes bR.....	138
4.2.2.1	Dynamik im Ethylenbereich.....	140
4.2.2.2	Dynamik im Schiffische Base-Bereich.....	143
4.2.2.3	Dynamik im Fingerprintbereich.....	145
4.2.2.4	Dynamische Wechselwirkung mit der Proteinumgebung.....	148
4.2.3	Untersuchung der (13-cis, 15-syn)-Spezies bR <sub>548</sub> aus dem Grundzustand.....	150
4.3	<i>Vergleich zwischen bR und HR</i> .....	158
4.3.1	Isomerisierung.....	158
4.3.2	Dynamik im elektronisch angeregten Zustand .....	159
4.3.3	Protein/Kofaktor-Wechselwirkung.....	163
4.3.4	Reaktionsmodelle.....	165

4.4	<i>Sensorrhodopsin</i> .....	167
4.4.1	Differenzspektrum im Ethylenbereich.....	167
4.4.2	Dynamik.....	168
4.5	<i>VIS-IR-Spektroskopie an Farbstoffen (Polymethinische Theorie)</i> .....	171
4.5.1	Die Farbstoffe p-DPD-b13 und DASPI.....	171
4.5.1.1	Spektren.....	172
4.5.1.2	Dynamik.....	173
4.5.1.3	Analyse und Diskussion.....	176
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b> .....	<b>188</b>
<b>6</b>	<b><u>Ausblick</u></b> .....	<b>193</b>
	<b><u>Anhang</u></b> .....	<b>194</b>
	<i>Ergänzungen zur Auswertung</i> .....	194
	<i>Photozyklus Sensorrhodopsin</i> .....	196
	<i>Primärreaktion DASPI</i> .....	198
	<b><u>Literaturreferenzen</u></b> .....	<b>199</b>
	<b><u>Publikationen</u></b> .....	<b>212</b>
	<b><u>Danksagung</u></b> .....	<b>213</b>
	<b><u>Lebenslauf</u></b> .....	<b>217</b>