

1 Einleitung/Zielsetzung

Die Biophysik ist eine Wissenschaft, die zwischen zwei naturwissenschaftlichen Disziplinen, der Biologie und der Physik, angesiedelt ist. Aufgrund dieser interdisziplinären Stellung schafft sie die für die Wissenschaft so wichtigen, angestrebten Synergieeffekte. Sie erklärt die Einwirkung physikalischer Faktoren auf die Funktionen des Lebens. Die molekulare Biophysik beschäftigt sich im Speziellen mit biogenen Makromolekülen, wie z. B. Halorhodopsin (HR) (Abb. 1.1/links) und Bakteriorhodopsin (bR) (Abb. 1.1/rechts), die sich in der Lipiddoppelschicht der Zellwand des Bakteriums *Halobacterium Salinarum* befinden. Die Funktion dieser Proteine, die einen Farbstoff, den Retinalchromophor, enthalten, ist nicht nur durch ihren chemischen Aufbau, sondern auch durch die räumliche Anordnung, also ihre Struktur bestimmt. Durch Absorption eines Photons durchlaufen beide Moleküle einen Photozyklus mit wohl definierten Zwischenstufen, den Intermediaten, an dessen Ende wieder der Ausgangszustand vorliegt. Während dieses Photozyklus werden Ionen über die Zellmembran gepumpt. Durch diesen Pumpvorgang vor allem durch bR bildet sich ein Ionengradient über die Zellwand aus, und die in diesem Gradienten gespeicherte Energie kann wiederum von der Zelle zur ATP-Synthese oder für andere Energie verbrauchende Prozesse benutzt werden. Das Verständnis von der effektiven Umwandlung von Sonnenenergie kann z. B. für die Entwicklung künstlicher Retinalproteine verwendet oder auf ganz andere Gebiete angewandt werden (Bionik)¹. Für HR wird während des Photozyklus ein Chloridion vom Zelläußeren in das Zellinnere transportiert. Dadurch wird beim HR die osmotische Balance während des Zellwachstums aufrechterhalten [Duschl1986]. Beim bR hingegen wird ein Proton in die entgegengesetzte Richtung gepumpt, was für die Ladungsbilanz äquivalent ist. Die Primärreaktion stellt den ersten, wichtigen Schritt des Photozyklus dar. Sie ist mit einer schnellen (ps-Zeitskala) und effizienten all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors verbunden (siehe Abb. 1.3). Durch die Isomerisierung wird der Ionen-Pumpvorgang eingeleitet. Da die Primärreaktion extrem schnell abläuft, muss sie mit Methoden der Kurzzeitspektroskopie untersucht werden. Die Primärreaktion des bR-Photozyklus ist eingehend mit verschiedenen physikalischen oder chemischen Methoden untersucht worden [Dobler1988][Ye1999][Mathies1988].

¹Bakteriorhodopsin lässt sich z. B. zur Wasserstoffgewinnung einsetzen. Es werden dabei Grünalgen und Bakteriorhodopsin verwendet. Zirkulierendes CO₂ wird von den Algen unter Abgabe von O₂ mit Wasserstoff beladen (Kohlenhydrat) und im Bakteriorhodopsin wieder entladen. Fehlt Stickstoff zur NH₃-Bildung, wird vom bR Wasserstoff freigesetzt [Schäfer2003].

Es konnte durch hochzeitaufgelöste Infrarot- Schwingungsspektroskopie für bR gezeigt werden, dass die Isomerisierung bereits nach ~ 500 fs abgeschlossen ist [Herbst2002/II]. In Kapitel 1.2 wird näher auf den Photozyklus des bR eingegangen.

HR ist neben bR wohl das wichtigste Retinalprotein (review-Artikel in: [Henderson1977] [Stoeckenius1979][Stoeckenius1982][Dencher1983][Lanyi1990] [Váró2000]). Die Primärreaktion des HR zeigt in Messungen mit sichtbarer fs-Spektroskopie interessanterweise zwei Zeitkonstanten: 1.5 ps und 8.5 ps [Arlt1995]. Arlt et al. haben aufgrund ihrer Messungen ein mögliches Reaktionsmodell für die Primärreaktion von HR aufgestellt. In ihrem Modell gibt es einen biphasischen Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes S_1 : Die Population des Franck-Condon-Zustandes verzweigt sich in einen reaktiven Teil, der sich entlang einer Isomerisierungscoordinate bewegt, und einen nicht-reaktiven Teil, der sofort wieder zum Grundzustand zerfällt. Daneben gibt es noch andere Reaktionsmodelle, die vom zuletzt genannten Modell deutlich differieren und sich

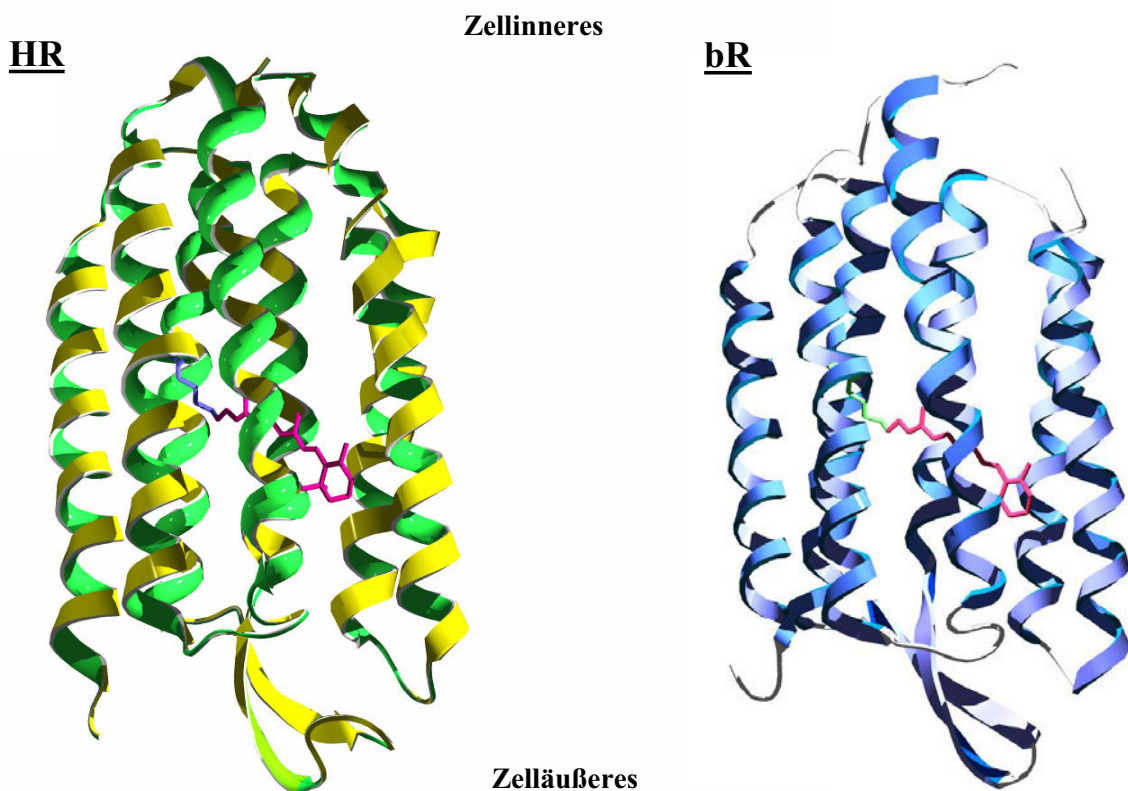


Abb. 1.1: links: HR-Struktur aus Röntgenstrukturanalyse. Das Protein ist gelb/grün markiert, und der Retinalchromophor rot. Der Retinalchromophor sitzt in einer Bindungstasche, die durch das Protein mit seinen sieben Helices gebildet wird. Das Retinalprotein befindet sich in der Lipiddoppelschicht der Zellwand des Bakteriums. In der Abbildung unten ist das Zelläußere, oben das Zellinnere. Rechts: bR-Struktur aus Röntgenstrukturanalyse. Blau markiert ist das Protein.

teilweise auch untereinander unterscheiden [Polland1985][Kandori1993/I][Kobayashi1998]. Alle zuletzt genannten Modelle begründen sich aus Messungen mit sichtbarer fs-Spektroskopie. Der Nachteil hierbei sind die breiten optischen Absorptionsbanden, die sich spektral stark überlappen. Dadurch lassen sich teilweise die verschiedenen Produktbanden und Eduktbanden schlecht unterscheiden. In der Literatur konnte sich bis heute kein allgemein akzeptiertes Reaktionsschema zur Primärreaktion herausbilden. Diese Arbeit versucht, diese Lücke deutlich zu verkleinern. Der Vorteil unserer Messmethode der hochzeit aufgelösten Infrarot-Schwingungsspektroskopie sind die zahlreichen und spektral schmalen Infrarotdifferenzbanden, deren Breite zwischen 12 cm^{-1} bis 18 cm^{-1} liegt. Mit der apparativen Auflösung von 3 cm^{-1} bis 5 cm^{-1} können diese Banden gut wiedergegeben werden. Die Probe wird mit sichtbarem Licht gepumpt/angeregt und mit Infrarotstrahlung geprobt. Mit einer Systemantwort von ca. 220 fs ist die Zeitauflösung hoch genug, um die schnelle Dynamik der Primärreaktion zeitlich auflösen zu können.

Für HR werden sich durch die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors nach Photoanregung dessen Infrarotfrequenzen für verschiedene Schwingungsmoden, wie z. B. der $\text{C}_{14}\text{-C}_{15}$ -Streckschwingungsmode, deren Frequenzbereich man auch Fingerprintbereich nennt, in den verschiedenen Intermediaten unterscheiden. Dadurch entstehen in den IR-Differenzspektren negative Bleichbanden des Ausgangszustandes zu frühen Zeiten und positive Produktbanden der Folgeprodukte. Untersucht man nun die zeitliche Entwicklung dieser IR-Banden, kann direkt auf die Dynamik der Photoprimärreaktion und ihrer beteiligten Intermediate geschlossen werden. Produkt- und Eduktbanden lassen sich gut voneinander trennen, was eine notwendige Voraussetzung für eine tiefer gehende Analyse ist. Wir können somit auf einer strukturellen Ebene die Primärreaktion untersuchen.

Zur Primärreaktion gibt es viele offene Fragen, wie z. B. zur Zeitkonstante der Isomerisierung, der Dynamik im elektronisch angeregten Zustand S_1 , der dynamischen Wechselwirkung des Retinalchromophors mit der Proteindynamik, dem molekularen Ursprung der beiden Zeitkonstanten und der Schwingungsdynamik „heißer“ Schwingungsbanden. Die vorliegende Arbeit untersucht diese Fragen und soll somit zum ersten Mal die direkte, schwingungsspektroskopische Herleitung eines Reaktionsmodells für die Primärreaktion von Halorhodopsin erbringen.

Neben Halorhodopsin wurde noch offenen Fragen zur Primärreaktion von Bakteriorhodopsin

nachgegangen. Die „hydrogen-out-of-plane“ (HOOP)-Schwingungen des Retinalchromophors sind dabei von besonderer Bedeutung: Die HOOP-Moden sind durch Schwingungen der Wasserstoffatome senkrecht zur Polyketten-Ebene charakterisiert. HOOP-Moden beobachtet man im Frequenzbereich um 960 cm^{-1} . Im Grundzustand des bR liegt die Polykette nahezu planar vor, was nur zu schwachen HOOP-Intensitäten führt. Bei Isomerisierung verdrillt die Polykette. Die Intensität der HOOP-Banden wird stärker¹. Da die Isomerisierung und die Verdrillung beim bR „Hand in Hand“ gehen, lässt sich aus der Dynamik der HOOP-Banden auf die Geschwindigkeit der all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung schließen.

Ferner wurde mit D_2O substituiertes bR untersucht. In nativem bR befindet sich H_2O . Tauscht man es gegen D_2O , so verändern sich die Positionen und Intensitäten von diversen IR-Schwingungsbanden. Aufgrund dieser Unterschiede lassen sich neue Erkenntnisse wie z. B. über die Wechselwirkung des Chromophors mit der Proteinumgebung oder aber den Protonierungszustand der Schiffsbasis, über die der Chromophor über ein Lysin kovalent an das Protein gebunden ist, gewinnen. Da wir nun neben der Primärreaktion des bR noch ein weiteres Retinalprotein, HR, kennen gelernt haben, macht es Sinn, über mögliche Gründe für Unterschiede in deren Primärreaktionen nachzudenken. bR und HR werden daher in Kapitel 4.3 in Hinblick auf Isomerisierung, Dynamik im elektronisch angeregten Zustand, Protein/Kofaktor-Wechselwirkung und Reaktionsmodelle verglichen.

Erste Experimente wurden an dem Retinalprotein Sensorrhodopsin NpSR-II aus dem *Natronobakterium Pharaonis* durchgeführt. Die Ergebnisse liegen jedoch noch nicht in ausreichendem Umfang für eine genauere Analyse vor.

Neben den Retinalproteinen wurden auch zwei synthetische Farbstoffe untersucht: DASPI und das doppelt-überbrückte Stilben-Derivat p-DPD-b13. Die *Polymethinische Theorie* [Dähne1966][Dähne1978] sagt den stufenlosen Übergang von Doppel- zu Einfachbindungen bei Photoanregung bzw. durch den Einfluss der Substituenten des Moleküls und die Auswirkungen auf IR-Spektren und Photochemie voraus. Hierzu wurde die Stilbenreihe veröffentlicht [Dekhtyar2001]. Bei Stilbazolium-Farbstoffen verhindert das Vorhandensein der Phenylringe eine Verlängerung der C=C-Doppelbindungen gegenüber den C-C-

¹ Die Verdrillung wird durch die beiden Faktoren der räumlichen Einschränkung des Retinals und dessen Isomerisierung bestimmt. In Resonanz-Raman-Messungen an bR wurde gezeigt, dass die HOOP-Intensitäten mit dem Isomerisierungsgrad des Retinalchromophors korreliert sind [Braiman1982][Smith1983].

Einfachbindungen [VanDerMeer2000][VanDerMeer2001]. Nicht die Drehung um die Doppelbindung führt zur strahlungslosen Auslöschung, sondern eine Drehung um die Einfachbindungen [VanDerMeer2001]. Da wir mit unserer Meßmethode Unterschiede in den Absorptionsfrequenzen für IR-Schwingungsmoden detektieren können, ist sie auch dafür geeignet, zwischen dem Einfach- oder dem Doppelbindungscharakter der Zentralbindung von DASPI bzw. p-DPD-b13 im elektronischen Grundzustand oder angeregten Zustand zu unterscheiden.

Je stärker das Molekül polarisiert ist, desto weiter verschiebt sich die IR-Schwingungsfrequenz für eine Doppelbindungs-Streckschwingungsmode zu höheren Wellenzahlen. Der Zusammenhang ist linear. Die Ergebnisse an DASPI und p-DPD-b13 sind ein wichtiger Ansatz, um auch für die Farbstoffe HR, bR oder andere Retinalproteine die Verschiebungen der Frequenzen für Streckschwingungsmoden und den Opsinshift (Frequenzdifferenz (PSBR in Protein)-(PSBR in Lösung)) berechnen zu können [Szepan2003].

1.1 Ablauf der photoinduzierten Primärreaktion der Chloridionenpumpe Halorhodopsin (HR)

HR

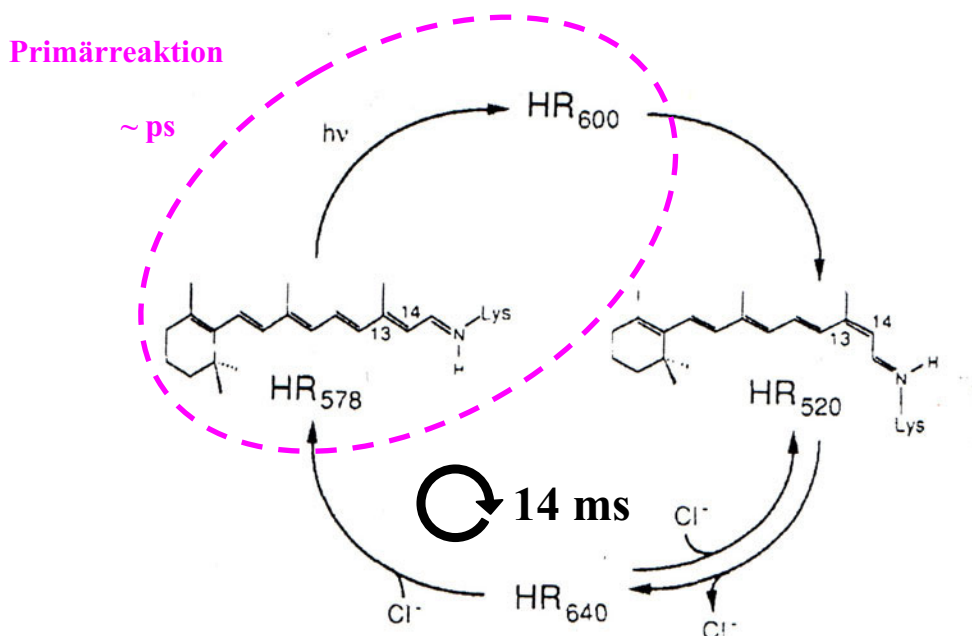


Abbildung 1.2: HR₅₇₈-Photozyklus [Ames1992] (Indizes≡ optisches Absorptionsmaximum). Markiert ist der von uns untersuchte Bereich der Primärreaktion. Die Zyklusdauer 14 ms ist [Tittor1987] entnommen.

Die Primärreaktion des HR nach Photoanregung läuft innerhalb einiger Pikosekunden ab. Nach Photoanregung des Grundzustandes HR_{578} durchläuft das Molekül mehrere Intermediate HR_{600} , HR_{520} , HR_{640} , bis es schließlich nach ~ 14 ms Zyklusdauer wieder beim Ausgangszustand HR_{578} angelangt ist. Die Indizes bezeichnen jeweils das optische Absorptionsmaximum. Abb. 1.2 zeigt den Photozyklus von HR_{578} . Farbig markiert ist der in dieser Arbeit untersuchte Bereich der Primärreaktion. Zwischen den Zuständen HR_{600} und HR_{520} wird ein Chloridion an das Zellinnere abgegeben und beim Übergang $HR_{640} \rightarrow HR_{578}$ wieder von außen aufgenommen [Ames1992]. Es wird ein Chloridion entgegen des Zellpotentials in die Zelle gepumpt, was beim Zellwachstum die osmotische Balance zwischen dem Zellinneren und der Umgebung bewahrt [Duschl1986]. Die Energie für diesen Ionentransport des Halobakteriums kann wie bei den meisten anderen Bakterien aus verschiedenen Quellen stammen, wie etwa der protonenmotorischen Kraft bei Atmung des Bakteriums oder Nitratreduktion [Hochstein1988], aus ATP, erzeugt durch die protonenmotorische Kraft oder durch anaerobe Fermentation von Arginin [Hartmann1980]. Die Absorption von Licht als Energiequelle für den Ionentransport durch das Retinal [Henderson1977] [Stoeckenius1978] [Stoeckenius1982][Lanyi1986][Oesterhelt1989] ist allerdings für die Halobakterien einzigartig. Halobakterien können daher unter sehr widrigen Bedingungen, zum Beispiel in ausgetrockneten Salztümpeln oder Salinen unter Sauerstoffentzug leben.

Der Retinalchromophor ist durch eine Bindungstasche in das Protein eingebettet und über eine protonierte Schiffische Base kovalent am Lys242 des Proteins gebunden. Die Polyenkette

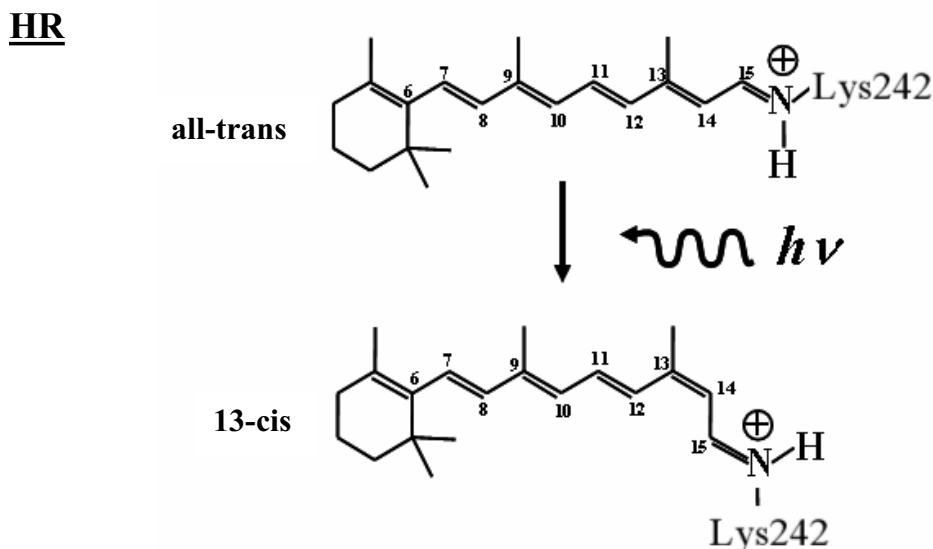


Abbildung 1.3: all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors von HR nach Photoanregung. Die Schiffische Base (NH) ist protoniert. Die Isomerisierung findet über die $C_{13}=C_{14}$ -Bindung statt.

des Retinalchromophors besteht aus sich abwechselnden Einfach- und Doppelbindungen. Das Ende dieser Kette mit delokalisiertem π -Elektronensystem bildet ein Iononring. Nach Photoanregung während der Primärreaktion dreht sich ein Teil des Retinalchromophors über seine $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung. Abb. 1.3 demonstriert die Strukturveränderung des Retinalchromophors bei dieser all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung.

Es sollen nun eine Reihe von existierenden Modellen zur Primärreaktion von HR kurz vorgestellt werden. Diese verschiedenen Modelle sind untereinander nicht konsistent. Kandori et al. [Kandori1992][Kandori1993] schlagen das Reaktionsschema in Abb. 1.4 vor: Dabei entsteht der 13-cis-Produktzustand HR_J innerhalb ≤ 1 ps direkt aus dem Franck-Condon-Zustand $HR^*(FC)$ über eine $C_{13}=C_{14}$ -Isomerisierungscoordinate. Der Zustand HR^* ist ein relaxierter Zustand auf der S_1 -Potentialoberfläche, der über eine von der $C_{13}=C_{14}$ -Isomerisierungscoordinate zu unterscheidenden Reaktionscoordinate simultan zu HR_J gebildet wird. Von HR^* wird angenommen, dass der Retinalchromophor in all-trans-Konfiguration vorliegt. Er soll über einen strahlenden, bzw. einen nicht-strahlenden Prozeß innerhalb 2.3 ps wieder zum Grundzustand HR (all-trans) zerfallen. Kandori et al. diskutieren die Möglichkeit, dass HR_J ein heißer HR_K -Zustand sein kann, der innerhalb ~ 3 ps nach HR_K relaxiert, obwohl sie in einer etwas früheren Veröffentlichung [Kandori1991] nur von einem Produktzustand $HR_K = HR_{600}$ ausgingen. Das Reaktionsschema von Kobayashi et al. [Kobayashi1998] gleicht dem von Kandori et al. bis ins Detail. Polland et al. [Polland1985] schlugen zwei unterschiedliche Schemata zur Primärreaktion vor

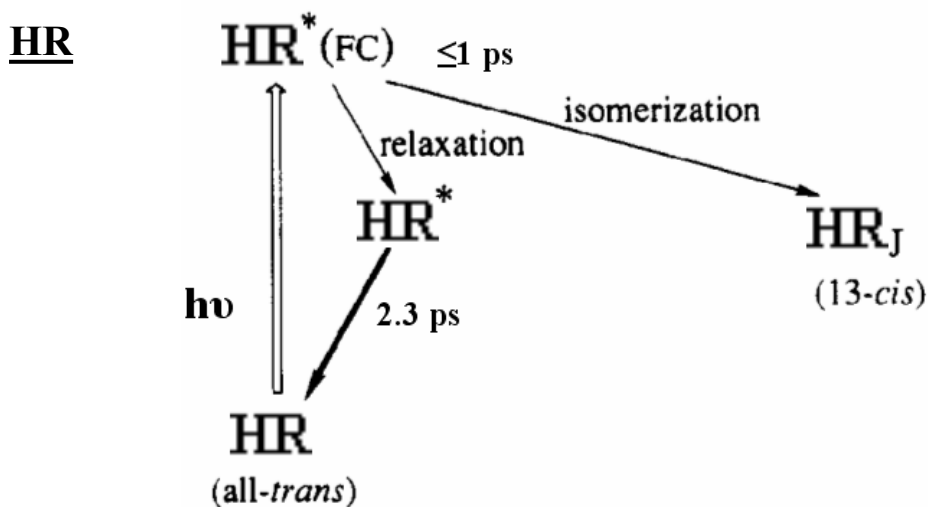


Abbildung 1.4: Reaktionsschema von Kandori et al. basierend auf optischer fs-Spektroskopie für die Primärreaktion von HR [Kandori1992].

(siehe Abb. 1.5). Im oberen Schema in Abb. 1.5 wird von der Bildung des Photoproduktes $S_0(HR_K)$ innerhalb ~ 5 ps aus einem angeregten Zustand S_1 ausgegangen. Gleichzeitig zerfällt S_1 zum Teil wieder in den Grundzustand $S_0(HR)$. Polland et al. konnten jedoch auf der Grundlage ihrer Messungen aus optischer fs-Spektroskopie nicht entscheiden, ob das Photoprodukt eventuell schneller entsteht. Um die Möglichkeit einer schnelleren Entstehung aufzuzeigen, schlugen Polland et al. noch ein modifiziertes Reaktionsschema vor (siehe Abb. 1.5/unten). In diesem Schema führten sie den zusätzlichen Zustand S_1' im elektronisch angeregten Zustand ein, der innerhalb der beobachteten Zeit 5 ps wieder zum Grundzustand zerfällt. Für die Produktentstehung zum $S_0(HR_K)$ wäre dann eine kürzere Zeit als 5 ps möglich. Auf der Basis ihrer Experimente können Polland et al. nicht zwischen ihren beiden Modellen unterscheiden. Das Schema von Kandori et al. aus Abb. 1.4 ähnelt dem erweiterten Schema von Polland et al. aus Abb. 1.5/unten, obschon hier kein heißer Produktzustand HR_J eingeführt wurde und sich die Zeiten für die Rück-

HR

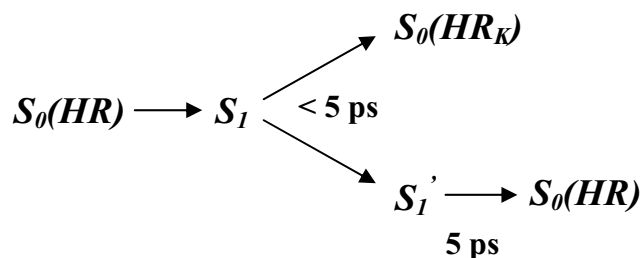
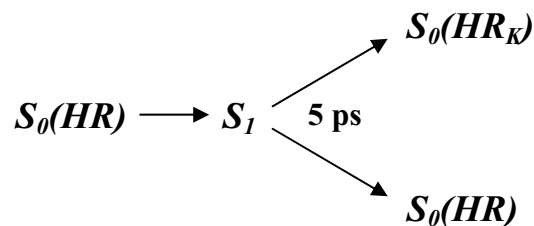


Abbildung 1.5: Reaktionsschemata von Polland et al. basierend auf optischer fs-Spektroskopie für die Primärreaktion von HR [Polland1985].

bildung des Grundzustandes deutlich unterscheiden.

Ein grundlegend anderes Reaktionsschema zur Primärreaktion wurde von Arlt et al. [Arlt1995] auf Grundlage ihrer Messungen mit optischer fs-Spektroskopie entwickelt. In Abb. 1.6 ist dieses Reaktionsschema zu sehen. Arlt et al. gehen von einem biphasischen Zerfall des Franck-Condon-Zustandes HR^{**} in zwei relaxierte Zustände auf der S_1 -Oberfläche innerhalb von ~ 170 fs aus. Der eine Teil der Population aus HR^{**} bewegt sich auf der S_1 -Oberfläche entlang einer Isomerisierungscoordinate. Der dabei entstehende relaxierte S_1 -Zustand reagiert zum Photoprodukt HR_{600} . Arlt et al. lassen die Möglichkeit offen, dass ein Teil der reaktiven Spezies auf der S_1 -Oberfläche wieder zum Grundzustand zerfällt. Der andere Teil der ursprünglichen HR^{**} -Population bewegt sich entlang einer allgemeinen Reaktionscoordinate zu einem nicht-isomerisierenden S_1 -Zustand, der direkt zum Grundzustand S_0 zerfällt. Dass Kandori et al. die ultrakurze Zeitkonstante von 170 fs nicht gemessen haben, liegt an deren Zeitaufösung von 0.5 ps. Die Systemantwort bei Arlt et al. lag bei ~ 150 fs. Neben der ultrakurzen Zeitkomponente beobachteten Arlt et al. zwei weitere Zeiten in der Dynamik der Absorptionsänderungen: 8.5 ps und 1.5 ps. Eine Zuordnung der Zeit für die Produktentstehung zum HR_{600} konnte noch nicht getroffen werden. Arlt et al.

HR

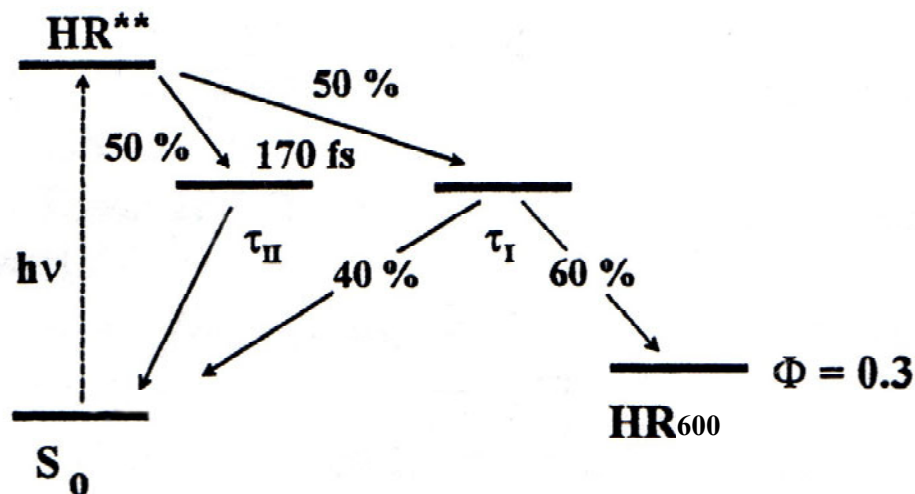


Abbildung 1.6: Reaktionsschema von Arlt et al. basierend auf optischer fs-Spektroskopie für die Primärreaktion von HR [Arlt1995]. Die Prozentzahlen sind die Anteile der Spezies, die in bestimmte Zustände zerfallen. Die Quantenausbeute liegt bei 34 % [Oesterhelt1985].

halten es auch für möglich, dass der molekulare Ursprung für die beiden Reaktionskanäle eine Heterogenität des Grundzustandes sein könnte. Nach Váró et al. liegt für Halorhodopsin aus dem *Halobacterium Salinarum* (sHR) im Grundzustand der Retinalchromophor von ca.

17 % der Moleküle selbst im hell-adaptierten Zustand in (13-cis, 15-syn)-Konfiguration vor [Váró1995/II] (siehe Abb. 4.36). Diese „13-cis-Spezies“ durchläuft ihren eigenen Photozyklus. Eventuell beobachteten Arlt et al. die parallel ablaufenden Primärreaktionen der Spezies mit all-trans-Konfiguration und der mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration. In Kapitel 4.1.3 wird der Einfluss dieser 13-cis-Spezies auf unsere Messungen untersucht.

Abb. 1.6 gibt das Reaktionsschema für HR nach Arlt et al. wieder: Die beiden Zustände in der zweiten Ebene von oben sind die nicht-reaktive Spezies (links) und die reaktive Spezies (rechts) auf der S_1 -Potentialoberfläche. Abb. 1.7 zeigt die schematischen Potentialoberflächen für die Primärreaktion von HR des elektronischen Grundzustandes und des ersten, angeregten Zustandes. Bei der reaktiven Spezies im S_1 kommen sich die Potentialoberflächen sehr nahe.

HR

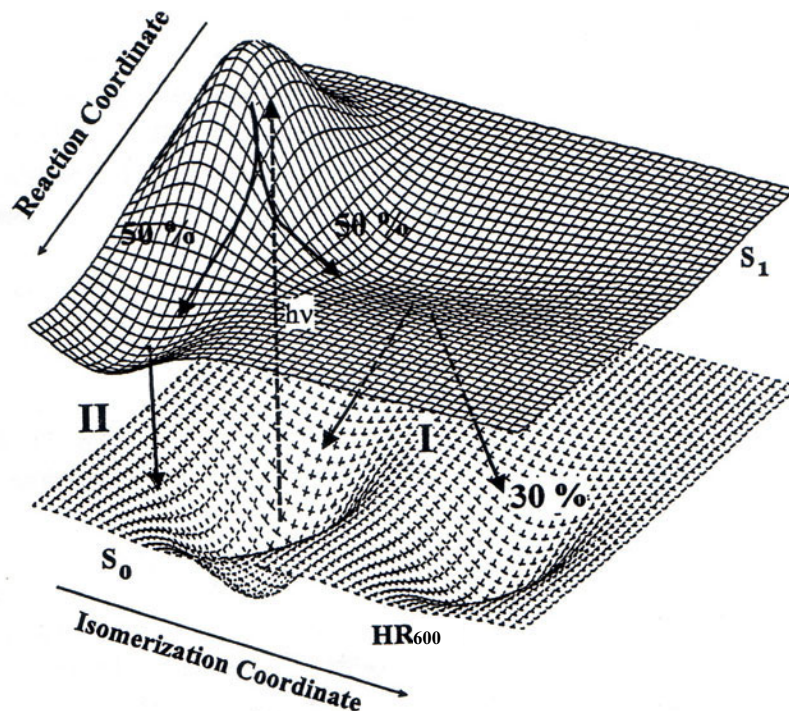


Abbildung 1.7: Schematische Potentialoberflächen für die Primärreaktion von HR [Arlt1995]. Den zwei Zerfallskanälen des elektronisch angeregten Zustandes werden zwei verschiedene Reaktionskoordinaten zugeordnet: eine Isomerisierungscoordinate und eine nicht-reaktive, allgemeine Coordinate.

1.2 Ablauf der photoinduzierten Primärreaktion der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (bR)

Wie HR führt bR nach Photoanregung eine all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors durch. Im Laufe des Photozyklus wird ein Proton vom Zellinneren zum Zelläußeren gepumpt. Der Photozyklus des bR-Wildtyps bei neutralem pH-Wert ist in Abb. 1.8 gezeigt. Beim Übergang $L_{550} \rightarrow M_{410}$ wird ein Proton an das Zelläußere abgegeben.

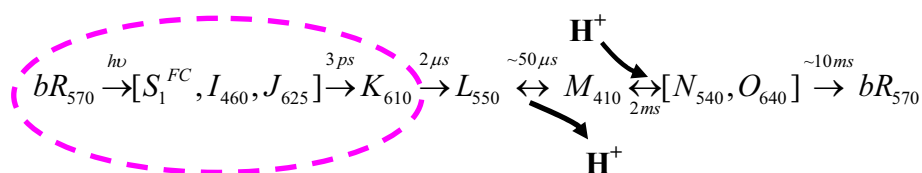


Abbildung 1.8: Photozyklus von bR. Die Zyklusdauer beträgt ca. 10 ms. Die Primärreaktion ist farbige umrandet.

Die Deprotonierung der Schiffsbasis findet gleichzeitig statt. Im Reaktionsschritt

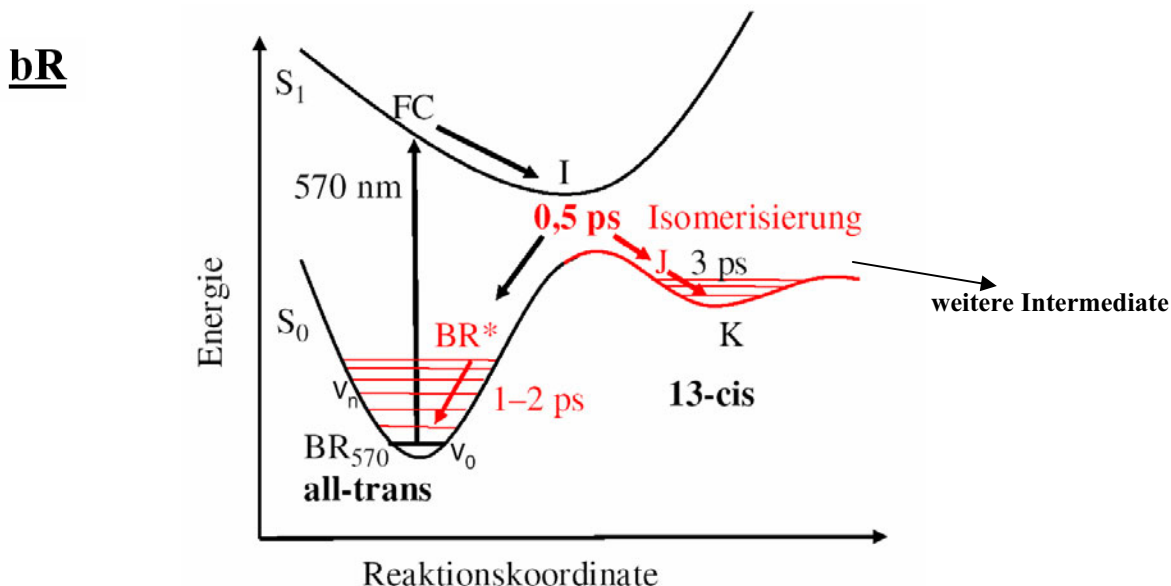


Abbildung 1.9: Erweitertes Potentialbild von bR [Dobler1988] [Mathies1988] (aus [Herbst2002/I]). Die rot eingezeichneten Komponenten stellen die Erweiterung durch Herbst et al. dar. Mit 0,5 ps zerfällt der Zustand I auf der S_1 -Oberfläche nach J (Isomerisierung) und nach BR^* . J ist ein heißer K-Zustand, dessen Retinalchromophor bereits in 13-cis-Konfiguration vorliegt und sich in 3 ps nach K abkühlt. BR^* ist der heiße Grundzustand, der innerhalb 1-2 ps nach BR_{570} relaxiert.

$M_{410} \rightarrow N_{540}$ erfolgt die Aufnahme eines Protons durch das Protein an der Zellinnenseite und

die Reprotonierung der Schiffischen Base. Zur Beschreibung der Primärreaktion von bR dient das durch Herbst et al. erweiterte Potentialschema [Herbst2002/I] von Dobler et al. und Mathies et al. [Dobler1988][Mathies1988]. Abb. 1.9 zeigt dieses Reaktionsschema. Die Quantenausbeute der Photoreaktion beträgt 64 %.

Atkinson et al. haben vor kurzem noch auf Grundlage ihrer CARS-Messungen im HOOP-Bereich des bR-Wildtyps gefolgert, dass die Isomerisierung des Retinalchromophors erst im $J \rightarrow K$ -Übergang stattfindet [Atkinson2000]. Dabei verglichen sie das CARS- J -Spektrum mit dem CARS-Spektrum von bR5.12. bR5.12 ist ein modifiziertes bR, bei dem durch Einfügen eines Fünferkohlenstoffringes an der Position 12 der Polyenkette des Retinalchromophors eine $C_{13}=C_{14}$ -Isomerisierung desselben verhindert wird. Aus diesen Messungen wurde von Atkinson et al. abgeleitet, dass das J -Intermediat keine 13-cis-Struktur in seinem Retinalchromophor aufweist. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch den Messungen von Dobler et al., Mathies et al. und Herbst et al., die davon ausgehen, dass bereits im J -Intermediat der Retinalchromophor in 13-cis-Konfiguration vorliegt. Eine Messung im HOOP-Bereich des nativen bR mittels tansienter IR-Schwingungsspektroskopie kann zeigen, wie schnell die breite HOOP-Bande um 957 cm^{-1} entsteht. Durch die Isomerisierung und die räumliche Einschränkung des Retinalchromophors verdrillt sich dieser. Bei einer Verdrillung werden jedoch auch die HOOP-Banden stärker. Die Isomerisierung verläuft somit simultan zur Entstehung der HOOP-Banden. Daher ist die Zeitkonstante für die Entstehung der HOOP-Banden die gleiche wie für die Isomerisierung. Unsere Messungen im HOOP-Bereich in Kapitel 4.2.1 sollen Aufschluß geben über die Entstehungszeit der HOOP-Banden und damit den Isomerisierungszustand des Retinalchromophors von bR im J -Intermediat erneut festlegen.

1.3 Sensorrhodopsin

Neben bR und HR befinden sich noch zwei weitere retinalenthaltende Transmembranproteine im *Halobakterium Salinarum*: Sensorrhodopsin I und II. Alle vier Retinalproteine weisen eine hohe strukturelle Verwandtschaft auf, wie Abb. 1.10/rechts zeigt. Im *Natronobakterium Pharaonis* ist lediglich ein Sensorrhodopsin NpSR-II identifiziert worden. Sensorrhodopsin ist ein Photosensor, mit dessen Hilfe das Bakterium seine Schwimmbewegungen nach den Lichtverhältnissen koordiniert. Das Übertragungs-Protein (Transducer) pHtr-II überträgt dazu

die Signale vom NpSR-II über eine komplexe biochemische Signalkette an die Flagellen des Bakteriums. Die Bakterien halten sich somit u. a. von gefährlicher UV-Strahlung fern [Lutz2001/II]. Details zum Photozyklus stehen im Anhang/Photozyklus Sensorrhodopsin.

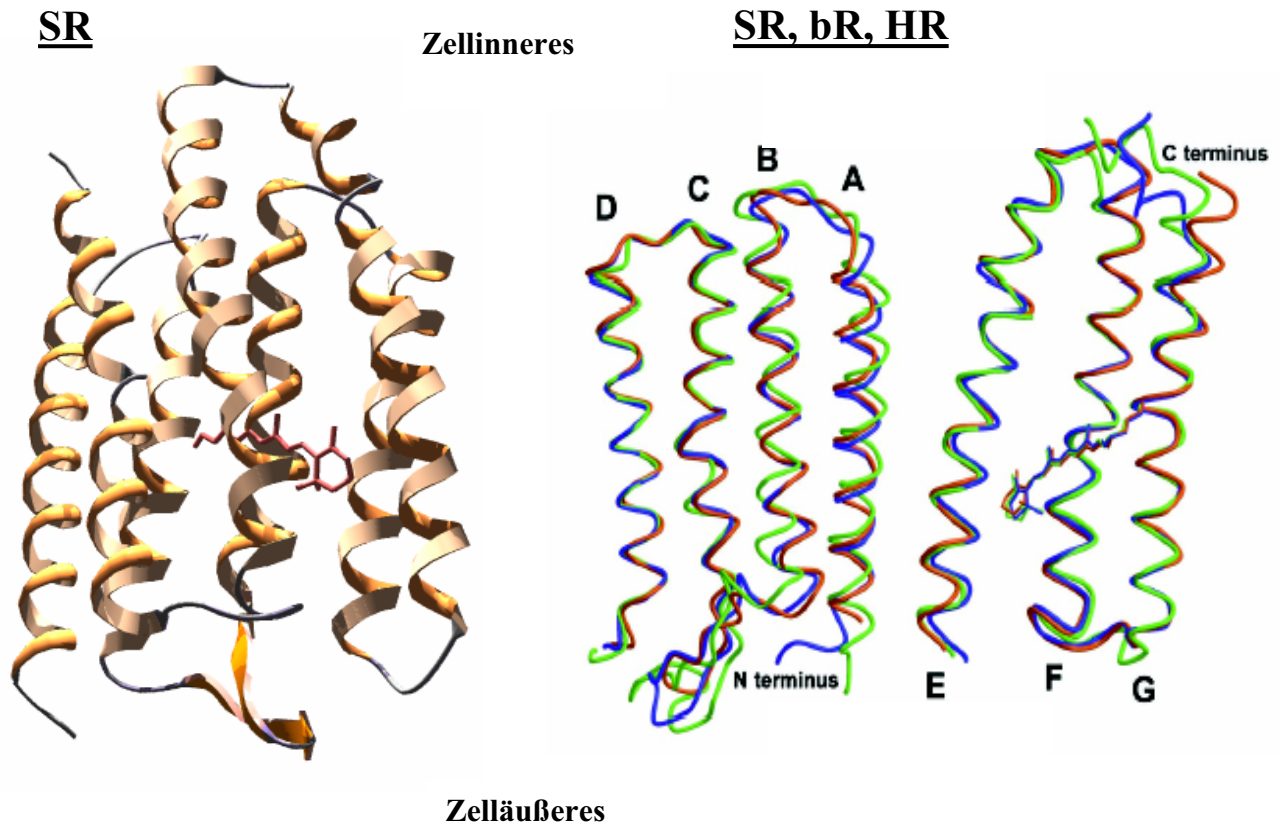


Abbildung 1.10: links: NpSR-II-Struktur aus Röntgenstrukturanalyse. Rechts: Strukturen von NpSR-II (orange), bR (blau) und HR (grün) aus der Röntgenstrukturanalyse [Royant2001]. Helices C-G, die die Bindungstasche für den Retinalchromophor bilden, sind sich sehr ähnlich. Unterschiede gibt es in der BC-Schleife und in den N- und C-Termini.

Abb. 1.11 zeigt in einer Übersichtsdarstellung das *Halobacterium Salinarum* mit seinen Transmembranproteinen und deren Funktion.

Da über die Primärreaktion des NpSR-II noch relativ wenig bekannt ist, haben wir auch für dieses Retinalprotein erste Experimente zur Aufschlüsselung der Primärreaktion mit transientser IR-Schwingungsspektroskopie durchgeführt.

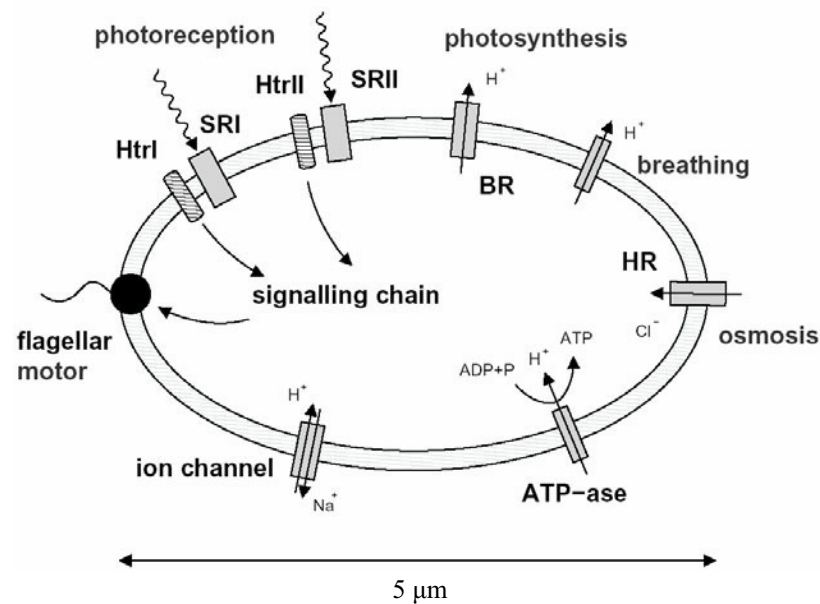


Abbildung 1.11: *Halobacterium Salinarum* mit seinen Transmembranproteinen [Lutz2001/II].

1.4 Ultraschnelle photoinduzierte Dynamik der Farbstoffe p-DPD-b13 und DASPI

Aus theoretischen Betrachtungen für eine Reihe von Polyenen und aromatischen Polyenen mit Donor- und Akzeptor-Substituenten zur Erhöhung der Polarisierung des π -Elektronensystems ist bekannt, dass durch Photoanregung der Farbstoffe alternierende Einfach- und Doppelbindungen beeinflusst werden [Rettig2003]. Die sogenannte polymethinische Schwelle, auch Cyanin-Limit (CL) genannt, stellt einen Zustand dar, der sich bei Polarisierungen des π -Elektronensystems zeigt, wenn die Wellenfunktionen vom Grund- und elektronisch angeregten Zustand zu gleichen Teilen aus den zwei limitierenden Resonanzstrukturen, aromatischer- und chinoider Zustand, bestehen (Abb. 4.88/links) [Dähne1990]. Bei den Farbstoffen DASPI und p-DPD-b13, einem doppelt überbrückten Stilben-Derivat, ist dieses Limit bereits überschritten. Für Stilbene und auch für Polyene gibt es theoretische Herleitungen dafür, dass der Doppelbindungscharakter der Zentralbindung nach Photoanregung verringert wird, wobei die benachbarten Einfachbindungen mehr Doppelbindungscharakter erhalten. Dabei ändern sich auch die Kraftkonstanten für die Schwingungen der Moleküle. Die Absorptionsfrequenz der Streckschwingung, die mit der zentralen Bindung korrespondiert, zeigt daher eine negative Frequenzverschiebung nach Anregung des Moleküls. Zur theoretischen Berechnung der Verschiebung kann die *Polymethinische Theorie* (siehe Kapitel 2.3) verwendet werden, die den stufenlosen Übergang

von Doppel- zu Einfachbindungen nach Photoanregung voraussagt.

Für Donor/Akzeptor-Stilben-Derivate hingegen mit einer relativ hohen substituenteninduzierten Polarisierung, wie DASPI und p-DPD-b13, müsste sich die Frequenz für die Ethen-Streckschwingung des elektronisch angeregten Zustandes gegenüber dem Grundzustand erhöhen. Die Zentralbindung erhält dabei im elektronisch angeregten Zustand noch mehr Doppelbindungscharakter.

Mit unseren Experimenten wollen wir untersuchen, ob es tatsächlich zu dieser Verschiebung bei DASPI und p-DPD-b13 kommt.

In Abb. 1.12 sind die Farbstoffe DASPI und p-DPD-b13 dargestellt. DASPI führt nach Photoanregung hauptsächlich eine Drehung um die beiden zentralen Einfachbindungen aus (siehe Abb. 1.12/links)¹. Es isomerisiert aber nicht nach cis [Strehmel1997]. Das führt zu Rotameren².

p-DPD-b13³ kann aufgrund der Überbrückung der meisten Bindungen nur eine Drehung über seine zentrale Doppelbindung durchführen, wodurch sich die S₁-Lebensdauer deutlich verlängert. p-DPD-b13 führt dabei eine trans-cis-Isomerisierung durch [Sczegan2001]. Bei den nicht-überbrückten Farbstoffen DPD und DASPI⁴ wird ein verstärkter, strahlungsloser Zerfall

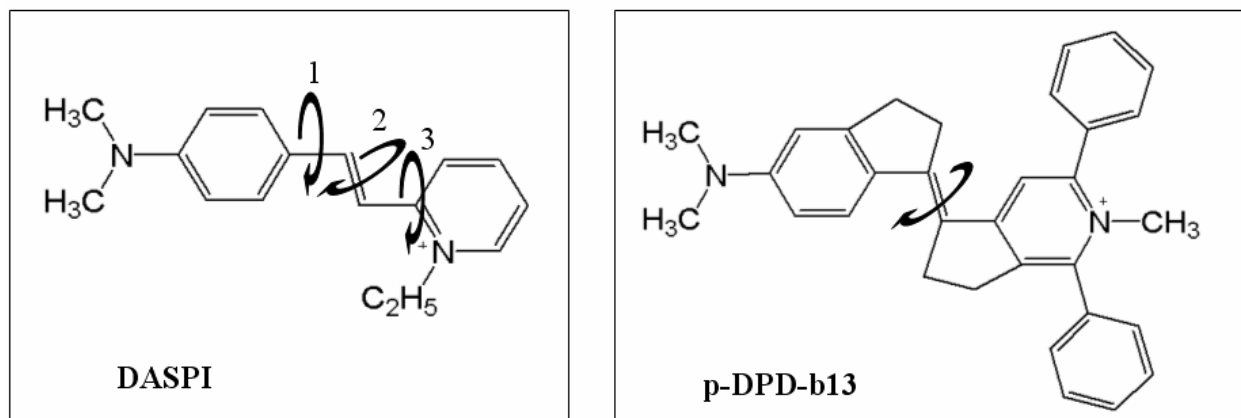


Abbildung 1.12: Strukturformeln von DASPI (links) und p-DPD-b13 (rechts).

beobachtet, der sich aus Torsions- und Biegeschwingungen von funktionellen Gruppen ergibt. Diese sind über Einfachbindungen an das Molekül gebunden. Dadurch kommt es zu einer

¹ Dabei findet die Drehung (Abb. 1.12: Einfachbindung 1) bevorzugt über die Phenylgruppe statt [Ephardt1991][Kim1999].

² Rotamere sind Konformationsisomere, die durch Rotation um Einfachbindungen ineinander überführbar sind.

³ Die Bezeichnung „p“ in p-DPD-b13 steht für „para“. Sie kennzeichnet die Position der Ethylgruppe am rechten Kohlenstoffring in Abb. 1.12/rechts. Beim verwendeten DASPI-Farbstoff liegt die Ethylgruppe in „ortho“-Konfiguration vor (o-DASPI).

⁴ DASPI und DPD, das ein DASPI-Derivat ist, sind isoelektronisch, d. h. sie haben dieselbe Elektronenkonfiguration. DASPI und DPD zeigen daher ähnliche physikalische Eigenschaften. DASPI wird von uns ersatzweise für DPD verwendet.

Kopplung zwischen dem angeregten Zustand und den vielen Schwingungsmoden des Grundzustandes: Der strahlungslose Übergang vom S_1 zum S_0 wird somit begünstigt [Lewis1939][VanDerMeer2000]. Eine neuere Erklärung für den strahlungslosen Übergang vom S_1 zum S_0 ist die „interne Konversion“. Der $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang erfolgt durch eine „konische Durchschneidung“, an der der S_1 und der S_0 energetisch entartet sind [Becker1991]. Dass bei DASPI und DPD die zentrale Doppelbindung weniger am strahlungslosen Zerfall als die benachbarten Einfachbindungen beteiligt ist, erklärt, weshalb diese Farbstoffe eine so hohe photochemische Stabilität aufweisen (Drehung um die Einfachbindungen führen strahlungslos zum Ausgangsisomer zurück) [Sczegan2003]. DASPI wird aufgrund dieser Eigenschaft auch als sättigbarer Absorber zur Modenkopplung von Laserpulsen eingesetzt [Sibbett1983][Brackmann1994].

Die Ergebnisse der Messungen an diesen Farbstoffen sind eine Basis, um zu verstehen, warum bei der Photoisomerisierung des bR bzw. HR nicht nur eine Drehung um die $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung, sondern auch Drehungen um Einfachbindungen involviert sind [Liu1985][Liu2000][Liu2001].

Ausserdem wird für die Farbstoffe bR und HR eine Grundlage geschaffen, für diese den Opsinshift und die Verschiebung der Absorptionsfrequenzen für Schwingungsmoden beim Übergang vom Grundzustand zum elektronisch angeregten Zustand berechnen zu können.