

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Primärreaktion nach Photoanregung von Halorhodopsin und Bakteriorhodopsin aus dem Bakterium *Halobacterium Salinarum* mittels hochzeitaufgelöster Infrarot-Schwingungsspektroskopie und optischer fs-Spektroskopie untersucht. Bei der Primärreaktion führt der Retinalchromophor eine durch die Proteinumgebung gesteuerte all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung um seine C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung durch. Dabei entsteht beim HR das primäre 13-cis-Photoprodukt  $HR_{600}=HR_K$ . Vorteile der hochzeitaufgelösten Infrarot-Schwingungsspektroskopie gegenüber der optischen fs-Spektroskopie sind die schmalere spektrale Breite und die große Anzahl der Infrarotbanden, die Aussagen über die strukturelle Dynamik erlauben. HR und bR durchlaufen nach Photoanregung ihren Photozyklus mit definierten Zwischenstufen, den sogenannten Intermediaten. Während des Photozyklus wird beim HR ein Chloridion vom Zelläußeren zum Zellinneren des Bakteriums gepumpt, wodurch die osmotische Balance während des Zellwachstums aufrechterhalten wird [Duschl1986]. Beim bR wird ein Proton vom Zellinneren zum Zelläußeren gepumpt, wobei sich ein Gradient über die Zellmembran aufbaut. Die in diesem Gradienten gespeicherte Energie kann u. a. zur ATP-Synthese verwendet werden. Die Isomerisierung ist der erste wichtige Schritt des Photozyklus.

### **Halorhodopsin**

Zur Primärreaktion von HR gibt es verschiedene Modellansätze, die auf Messungen an HR-Suspensionen mit optischer fs-Spektroskopie basieren [Kandori1991][Kandori1992][Kandori1993/I][Arlt1995][Kobayashi1998]. In unseren Messungen mit optischer fs-Spektroskopie an hydratisierten HR-Filmen zeigen sich für die Dynamik der Primärreaktion die drei Zeitkonstanten 6.6(8) ps, 1.5(3) ps und 0.3(1) ps. Das ist mit den von Arlt et al. gefundenen Zeitkonstanten 8.5(1.5) ps, 1.5(7) ps und 170(70) fs als konsistent zu betrachten. Unsere HR-Filme sind somit mit HR-Suspensionen in Bezug auf die Dynamik vergleichbar.

Zur Primärreaktion von HR gibt es noch viele offene Fragen, die sich allein mit optischer fs-Spektroskopie nur schwer beantworten lassen. Da der Ausgangszustand von HR eine heterogene Zusammensetzung mit zwei unterscheidbaren Spezies hat, stellt sich die Frage, ob die beobachteten Zeitkonstanten 6.6 ps und 1.5 ps jeweils einer Spezies zugeordnet werden

müssen, oder ob sie zu der Dynamik nur einer Spezies gehören. Auch ist offen, mit welcher Zeitkonstante die Entstehung des primären Photoproduktes  $HR_{600}$  verbunden ist.

Um u. a. diese wichtigen Fragen zu klären, untersuchten wir unsere HR-Filme mit transienter IR-Schwingungsspektroskopie. Damit ließen sich mit einer Systemantwort von ca. 240 fs und bei einer spektralen Auflösung von  $3\text{ cm}^{-1}$  bis  $5\text{ cm}^{-1}$  die Dynamik von Produkt- und Eduktbanden gut voneinander trennen. Zum ersten Mal konnte anhand von Markerbanden für die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung im Frequenzbereich der C-C-Streckschwingungen („Fingerprintbereich“) und im Bereich der C=C-Streckschwingungen („Ethylenbereich“) des Retinalchromophors gezeigt werden, dass die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung bzw. die Entstehung des Photoproduktes  $HR_{600}$  mit einer kurzen Zeitkonstante von 2.0(1) ps abläuft. Auch in der Dynamik des Rückgangs der Bleichbanden sind Anteile der 2 ps-Zeitkomponente. In unseren Experimenten zeigt sich zusätzlich eine lange Zeitkonstante von 7.7(5) ps, die eindeutig mit der Wiederbesetzung des Ausgangszustandes verbunden ist: Die Amplitudenspektren aus den globalen Fits und die SVD-Spektren dieser Zeitkonstante haben an den Positionen der Bleichbanden die Form von Absorptionsbanden. Der elektronisch angeregte Zustand  $S_1$  zerfällt im Gegensatz zu bR mit zwei verschiedenen Zeitkonstanten, was experimentell direkt an der unterschiedlichen Dynamik des Zerfalls von instantan vorhandenen positiven Banden belegt werden konnte. Unsere Messungen zeigen, dass der Franck-Condon-Zustand zuerst in zwei relaxierte  $S_1$ -Zustände zerfällt. Das System verzweigt sich demnach auf der  $S_1$ -Oberfläche entlang einer reaktiven Isomerisierungscoordinate und einer nicht-reaktiven Coordinate. Das relaxierte  $S_1$ -Intermediat, welches entlang der nicht-reaktiven Coordinate entstanden ist, geht direkt wieder mit 7.7 ps in den Ausgangszustand über. Das reaktive Intermediat zerfällt innerhalb von 2 ps in den Produktzustand  $HR_{600}$  und zu einem Teil wieder in den Ausgangszustand. Eine ultraschnelle Zeitkomponente von 0.3(1) ps, die dem Zerfall des Franck-Condon-Zustandes zugeordnet ist, war eindeutig bei unseren vorbereitenden Messungen mit optischer fs-Spektroskopie mit einer Systemantwort von nur 50 fs zu beobachten.

Der Ausgangszustand des HR hat eine heterogene Zusammensetzung:  $\sim 17\%$  der Moleküle liegen in (13-cis, 15-syn)- und  $\sim 83\%$  in all-trans-Konfiguration des Retinalchromophors vor [Váró1995/II]. Beide Spezies durchlaufen ihren eigenen Photozyklus. Es stellt sich daher die Frage, ob die beobachteten Zeitkonstanten 2 ps und 7.7 ps jeweils zu einer Spezies des Ausgangszustandes gehören. Unsere Ergebnisse

zu dem Einfluss der (13-cis, 15-syn)-Grundzustandsspezies auf unsere Messungen zeigen jedoch, dass wir mit den beiden Zeitkonstanten die Photoreaktion nur einer Spezies mit zwei Reaktionskanälen beobachten: der all-trans-Spezies aus dem Ausgangszustand.

Neben der Dynamik des Retinalchromophors beobachteten wir auch die Dynamik der Proteinumgebung. Im Amid-II-Bereich um  $1550\text{ cm}^{-1}$  entsteht das Bleichsignal verzögert mit einer Zeitkonstante von  $2.6(9)\text{ ps}$  und zerfällt dann mit  $13(5)\text{ ps}$ . Ein Erklärungsansatz ist die anfängliche Verdrillung des Retinalchromophors oder dessen Isomerisierung, wodurch eine sterische Wechselwirkung mit der Proteinumgebung bewirkt wird. Auch eine Überlagerung des schnellen Zerfalls einer  $S_1$ -Bande mit der langsamen Rückbildung einer Bleichbande würde das verzögerte Erscheinen des Bleichsignals erklären. Eine weitere Erklärung wäre, dass das durch den Pumpimpuls induzierte Dipolfeld des Chromophors geladene Molekülgruppen beschleunigt. Dadurch kommt es zu einer veränderten Ladungsverteilung in der Nähe des Chromophors, die bewirkt, dass sich die Schwingungsübergänge von geladenen Aminosäuren, der Schiffschens Base oder  $\text{H}_2\text{O}$  verändern.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte in Bezug auf das Reaktionsschema zur Primärreaktion von HR eine Lücke zwischen bereits existierenden Reaktionsschemata geschlossen werden. Die bei der Primärreaktion beobachteten Zeitkonstanten  $2\text{ ps}$  und  $7.7\text{ ps}$  entstammen nur einer Spezies aus dem heterogenen Ausgangszustand, der all-trans-Spezies. Damit ist der molekulare Ursprung dieser Zeitkonstanten geklärt. Die Entstehung des primären Photoproduktes  $HR_{600}$  bzw. die 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors geschieht eindeutig mit der kurzen Zeitkonstante  $2\text{ ps}$ . Die Wiederbesetzung des Ausgangszustandes ist durch die lange Zeitkonstante  $7.7\text{ ps}$  charakterisiert. Es zeigen sich jedoch auch Anteile an der Zeitkonstante  $2\text{ ps}$ . Der elektronisch angeregte Zustand des HR zerfällt im Gegensatz zum bR (Zerfall des  $S_1$  mit nur einer Zeitkonstante) simultan mit zwei Zeitkonstanten  $2\text{ ps}$  und  $7.7\text{ ps}$ , was sich mit der Existenz von zwei relaxierten  $S_1$ -Spezies erklären lässt.

### **Bakteriorhodopsin**

Als zweites wichtiges Modellsystem wurde bR untersucht. Für Bakteriorhodopsin konnte von Herbst et al. der direkte spektroskopische Beweis erbracht werden, dass die Primärreaktion, also die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors, mit der Entstehung des J-Intermediates einhergeht und innerhalb von  $500\text{ fs}$  abgeschlossen ist [Herbst2002/I][Herbst2002/II]. In der vorliegenden Arbeit wurden weiterführende Experi-

mente an bR mit transienter IR-Schwingungsspektroskopie im Spektralbereich um  $960\text{ cm}^{-1}$  der „hydrogen-out-of-plane“-Schwingungen (HOOP-Schwingungen) des Retinalchromophors durchgeführt. Auch die Dynamik einer  $\text{D}_2\text{O}$ -substituierten bR-Probe wurde im Bereich der C=ND-Streckschwingung untersucht.

Da sich bei der all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung der Retinalchromophor verdrillt, kann die Isomerisierung auch im HOOP-Bereich beobachtet werden. Die Entstehungszeit für die HOOP-Differenzbanden sollte der Zeit für die Isomerisierung entsprechen. In unseren Messungen entsteht eine breite Produktbande mit einem Zentrum bei  $963\text{ cm}^{-1}$  innerhalb von  $0.6(1)\text{ ps}$ , die dann wieder mit  $25(17)\text{ ps}$  zerfällt. Die kurze Entstehungszeit für die HOOP-Bande ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Isomerisierung des Retinalchromophors im J-Zustand des bR bereits abgeschlossen ist. Die lange Zerfallszeit von  $25\text{ ps}$  zeigt, dass der Retinalchromophor sich erst langsam wieder nach der Isomerisierung entdrillt. Die Zeitkonstante unterscheidet sich von den in anderen Spektralbereichen gefundenen Zeitkonstanten ( $0.5\text{ ps}$  und  $\sim 2\text{ ps}$ ), was bedeutet, dass die Entdrillung des Retinalchromophors eine besondere Dynamik aufweist. Die HOOP-Dynamik entspricht ungefähr der Dynamik im Amid-II-Bereich. Eine Korrelation zwischen der Protein- und Verdrillungsdynamik beruhend auf einem gegenseitigen Einfluss der Verdrillung des Chromophors und dem Protein wäre denkbar.

Für bR konnte eine dynamische Wechselwirkung des Retinalchromophors mit der Proteinumgebung nachgewiesen werden. Bei Substitution von  $\text{H}_2\text{O}$  mit  $\text{D}_2\text{O}$  im bR-Film war eine zuvor beim  $\text{H}_2\text{O}$ -bR gemessene negative IR-Bande zu späten Zeiten bei  $1649\text{ cm}^{-1}$  beim  $\text{D}_2\text{O}$ -bR nicht mehr zu sehen. Es liegt die Vermutung nahe, dass um  $1649\text{ cm}^{-1}$  die Biegeschwingungen eines  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls in der Nähe der Chromophor-Bindungsstelle, das durch die Isomerisierung in eine andere elektrostatische Umgebung verschoben wird, beobachtet wurde. Aus der Röntgenstrukturanalyse von bR gibt es Hinweise auf  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle in der Nähe der Chromophor-Bindungsstelle

### **Vergleich zwischen HR und bR**

HR zeigt im Gegensatz zu bR einen Zerfall des  $\text{S}_1$ , der mit zwei Zeitkonstanten abläuft, was sich aus der Existenz zweier relaxierter  $\text{S}_1$ -Spezies beim HR erklären lässt. Diese Unterschiede in der Photoreaktion leiten sich zum Teil aus einer veränderten Chromophor/Proteinwechselwirkung, welche die Reaktion steuert, ab. Auch haben Ladun-

gen in der Nähe der Schiffchen Base des Retinalchromophors einen Einfluss auf die Reaktion.

Beim bR entsteht das Bleichsignal um  $1550\text{ cm}^{-1}$  im Amid-II-Bereich ebenfalls verzögert mit einer Zeitkonstante von  $0.5\text{ ps}$  bis  $1\text{ ps}$  und zerfällt dann langsam. Es ist interessant, dass die Entstehungszeit der Bleichbande sowohl beim bR als auch beim HR der Zerfallszeit des  $S_1$  (bR) bzw. der reaktiven  $S_1$ -Spezies (HR) entspricht. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Isomerisierung des Retinalchromophors eine sterische Wechselwirkung mit der Proteinumgebung bewirkt. Eine anfängliche Verdrillung des Chromophors oder das durch den Pumpuls induzierte Dipolfeld, das zu einer modifizierten Ladungsverteilung in der Nähe des Chromophors führt, sind weitere Erklärungen für ein verzögertes Bleichsignal. Die Verzögerung liesse sich auch aus einer Überlagerung des  $S_1$ -Zerfalls mit dem Bleichbandenrückgang erklären.

Erste, vielversprechende Pilot-Experimente mit fs IR-Schwingungsspektroskopie wurden an Sensorrhodopsin II aus dem Bakterium *Natronobacterium Pharaonis* vorgenommen.

### **Messungen an den Farbstoffen DASPI und p-DPD-b13**

An den Farbstoffen p-DPD-b13 und DASPI wurden Messungen mit hochzeitaufgelöster IR-Schwingungsspektroskopie durchgeführt. Eine der Konsequenzen der polymethinischen Theorie ist der stufenlose Übergang von Doppel- zu Einfachbindungen nach Photoanregung und durch den Einfluss des Feldes, das durch die Substituenten des Farbstoffmoleküls induziert wird. Beim Übergang vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  verschiebt sich bei beiden Farbstoffen die Frequenz der C=C-Streckschwingung zu größeren Wellenzahlen. Diese Frequenzerhöhung deutet auf einen stärkeren Doppelbindungscharakter im elektronisch angeregten Zustand für die zentrale Bindung hin. Die für DASPI gemessene Frequenzverschiebung von  $13(2)\text{ cm}^{-1}$  entspricht der theoretisch errechneten Verschiebung von  $11\text{ cm}^{-1}$ . Die Ergebnisse können prinzipiell auch auf andere Farbstoffe, wie z. B. HR oder bR übertragen werden und eine Basis für die Frage darstellen, warum nicht nur die  $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung sondern auch Einfachbindungen bei der Isomerisierung involviert sind. Das könnte den von Liu et al. vorgeschlagenen 13-cis-Isomerisierungsmechanismus für bR oder andere Retinalproteine erklären [Liu1985][Liu2000][Liu2001]. Bei Kenntnis der Polarisation des  $\pi$ -Elektronensystems des Retinalchromophors und dessen Wechselwirkung mit der Proteinumgebung kann im Prinzip

auch die Absorptionsfrequenz der C=C-Streckschwingung im  $S_1$  und der Opsinshift berechnet werden [Sczepan2003].

## **6 Ausblick**

Für HR ist die Untersuchung der Dynamik der breiten HOOP-Bande um  $967\text{ cm}^{-1}$  von Interesse. Durch die sterische Einschränkung des Retinalchromophors verläuft dessen Verdrillung simultan zu seiner Isomerisierung. Hier könnte noch einmal die Zeitkonstante von 2 ps für die Entstehung des Photoproduktes  $HR_{600}$  an der Torsionsdynamik überprüft werden.

Messungen an HR mit geblocktem Retinal können Aufschluss geben über die Dynamik des elektronisch angeregten Zustandes ohne überlagernde Photozyklusreaktionen. Beim geblockten HR, analog zum bR5.12, ist der all-trans-Retinalchromophor an der  $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung durch einen Kohlenstoffring fixiert, d. h. eine Isomerisierung um diese Bindung wird verhindert. Die Ergebnisse der Messungen an bR5.12 haben gezeigt, dass im  $S_1$  die Position der C=C-Streckschwingung bei  $\sim 1570\text{ cm}^{-1}$  liegt und die Dynamik der Proteinumgebung durch das elektrische Dipolfeld des Retinalchromophors oder durch dessen anfängliche Verdrillung beeinflusst wird [Herbst2002/I]. Wie sehen die Verhältnisse beim geblockten HR aus?

Sensorrhodopsin führt wie bR und HR ebenfalls eine all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung um die  $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung des Retinalchromophors in einer leicht veränderten Proteinbindungstasche durch. Es ist daher interessant, die Dynamik der Primärreaktion und die damit verbundene Isomerisierung von Sensorrhodopsin genauer zu untersuchen.

Geplant sind ferner Experimente am Farbstoff DCS (Stilben-Derivat). DCS ist wie DASPI, p-DPD-b13 (Kapitel 4.5) und der Retinalchromophor in HR bzw. bR, ein Molekül mit konjugierten Doppelbindungen, das nach Photoanregung isomerisiert. Die Dynamik der Photoreaktion wird durch den Einfluss der Substituenten an den Kettenenden und die Polarität der Umgebung des Moleküls bestimmt. Von Interesse ist u. a., wie sich der Einfluss der Substituenten des DCS auf die C-C-Bindungsalternierung beim Übergang  $S_0 \rightarrow S_1$  auswirkt. Diese Alternierung wollen wir mit transientser IR-Schwingungsspektroskopie untersuchen. Die theoretisch berechneten Frequenzverschiebungen der C=C-Streckschwingung verschiedener Styren-Derivate aus Abb. 4.86 sollten experimentell überprüft werden.

## Anhang

### *Ergänzungen zur Auswertung*

In unseren Messungen mit optischer fs-Spektroskopie zeigte sich bei einer Probewellenlänge von 687 nm eine dritte, ultrakurze Zeitkomponente von 0.3(1) ps (Abb. 4.3). Bei Photoanregung in den Franck-Condon-Zustand ändern sich die Kernkoordinaten des Chromophors zuerst nicht. Dann findet eine Relaxation auf der  $S_1$ -Potentialoberfläche statt. Der ultrakurzen Zeitkonstante ordnet man diese Relaxation zu [Warshel1991][Arlt1995]. Schwingungsbewegungen oder eine schnelle initiale Reaktion führen innerhalb der ultrakurzen Zeit zu relaxierten Zuständen auf der  $S_1$ -Potentialoberfläche.

Diese ultrakurze Zeit müsste sich auch in unseren Experimenten mit transienter IR-Schwingungsspektroskopie zeigen. Da die Systemantwort bei unseren VIS/IR-Messungen bei „nur“  $\sim 220$  fs lag, ist es schwierig, ultraschnelle Signale zweifelsfrei nachzuweisen. Es soll aber dennoch unter dieser Einschränkung versucht werden, die im Ethylenbereich gemessenen Transienten einem globalen Fit mit drei Zeitkonstanten zu unterziehen. Betrachten wir aber vorab die Transiente und deren biexponentiellen Einzelfit bei  $1504\text{ cm}^{-1}$  in Abb. A.1. Dem

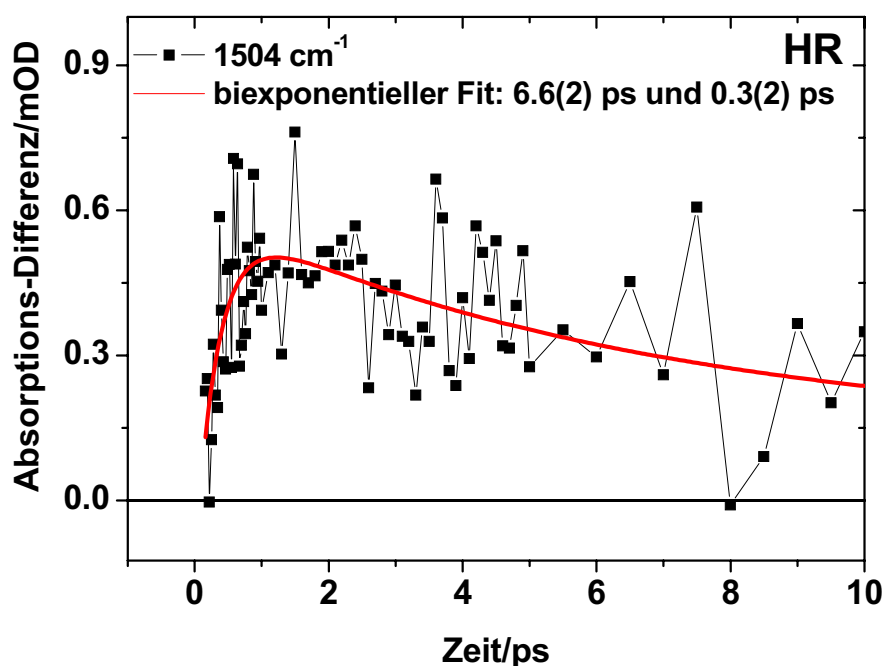


Abbildung A.1 : HR: Transiente bei  $1504\text{ cm}^{-1}$  mit biexponentiellem Einzelfit.

Einzelfit zufolge entsteht das Signal sehr schnell mit 0.3(2) ps und zerfällt langsam mit 6.6(2) ps. Die ultrakurze Entstehungszeit ist deutlich kleiner als die in den globalen Fits der Transienten im Fingerprint- und Ethylenbereich gefundene kurze Zeit von  $\sim 2$  ps. In Abb. A.2 ist der globale Fit mit drei Zeitkonstanten und das Ergebnis der SVD-Analyse gezeigt.

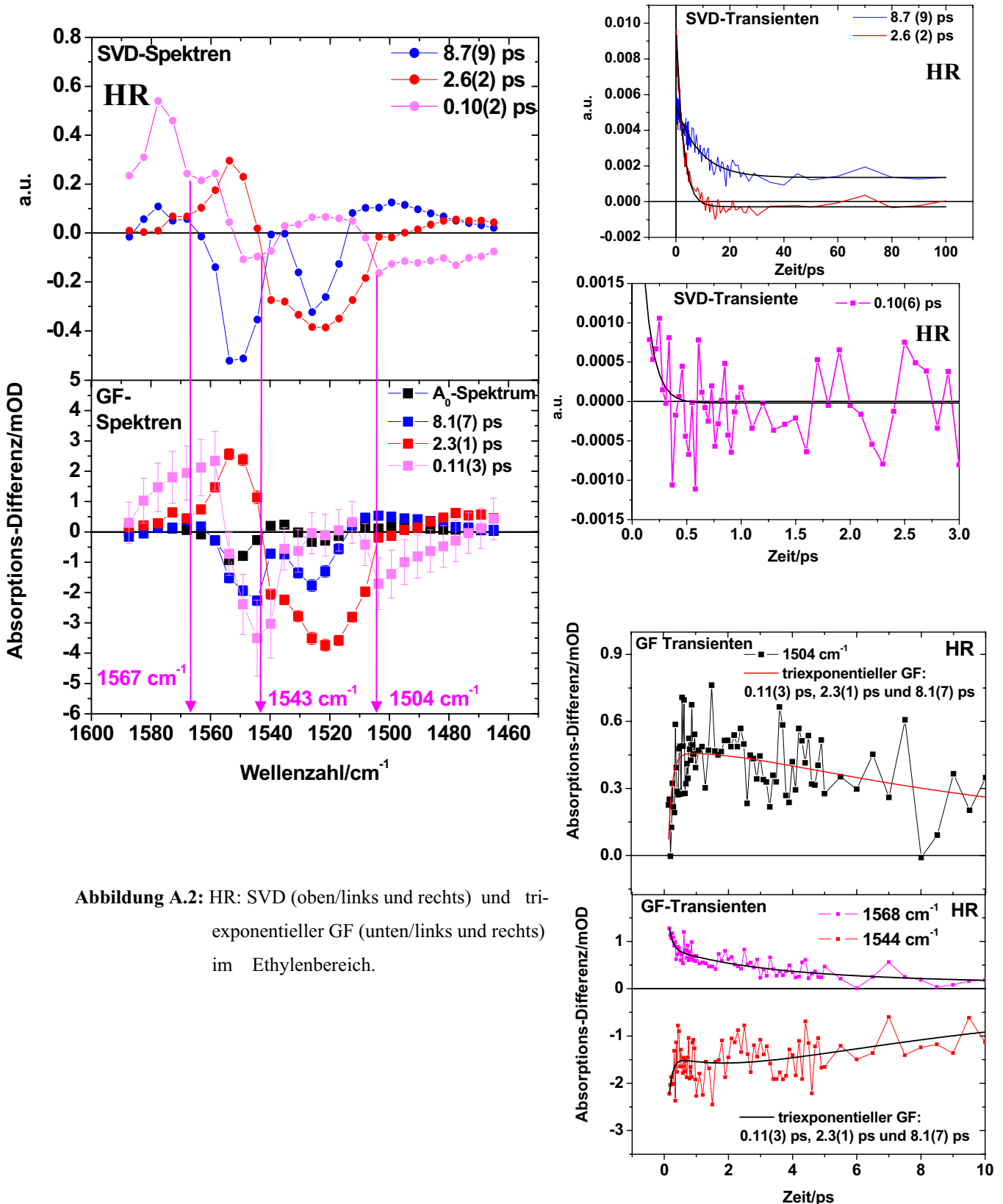


Abbildung A.2: HR: SVD (oben/links und rechts) und triexponentieller GF (unten/links und rechts) im Ethylenbereich.



Die Transienten werden erst ab 150 fs gefittet, um z. B.  $T_2$ -Effekte weitestgehend zu minimieren. Eine Entfaltung der Transienten wurde jedoch nicht durchgeführt. Die Analyse der GF- bzw. SVD-Spektren für die ultrakurze Zeitkonstante sind daher immer vor dieser Einschränkung zu betrachten.

Das dritt-relevanteste SVD-Spektrum gehört zu einer SVD-Transiente, die mit 0.10(6) ps zerfällt. Der GF mit drei Exponentialfunktionen findet drei Zeitkonstanten: 0.11(3) ps, 2.3(1) ps und 8.1(7) ps. Der Verlauf des 0.11 ps-GF-Spektrums ist in seiner Systematik dem 0.1 ps-SVD-Spektrum ähnlich. Beide Spektren zeigen oberhalb von  $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  ein positives Signal. Bei  $\sim 1543 \text{ cm}^{-1}$  liegt im 0.11 ps-GF-Spektrum ein Minimum vor, das im 0.1 ps-SVD-Spektrum nur schwach ausgebildet ist. Unterhalb von  $\sim 1510 \text{ cm}^{-1}$  zeigen beide Spektren einen breiten, negativen Signalverlauf, der bei ca  $1504 \text{ cm}^{-1}$  sein Minimum hat. Diesen Verlauf des 0.11 ps-GF-Spektrums könnte man so interpretieren, dass bei  $1504 \text{ cm}^{-1}$  die Produktbande einer  $S_1$ -Spezies sehr schnell mit der ultrakurzen Zeitkonstante 0.11 ps entsteht, die dann mit der langen Zeit von 8.1 ps wieder zerfällt (Abb. A.2: positives Signal des 8.1 ps-GF-Spektrums bei  $1504 \text{ cm}^{-1}$ ). Das entspräche der Dynamik von  $S_1^{loss}$  (Abb. 4.33). Die starke, positive Bande im 0.11 ps-GF-Spektrum um  $1567 \text{ cm}^{-1}$  könnte vom Zerfall des Franck-Condon-Zustandes herrühren.

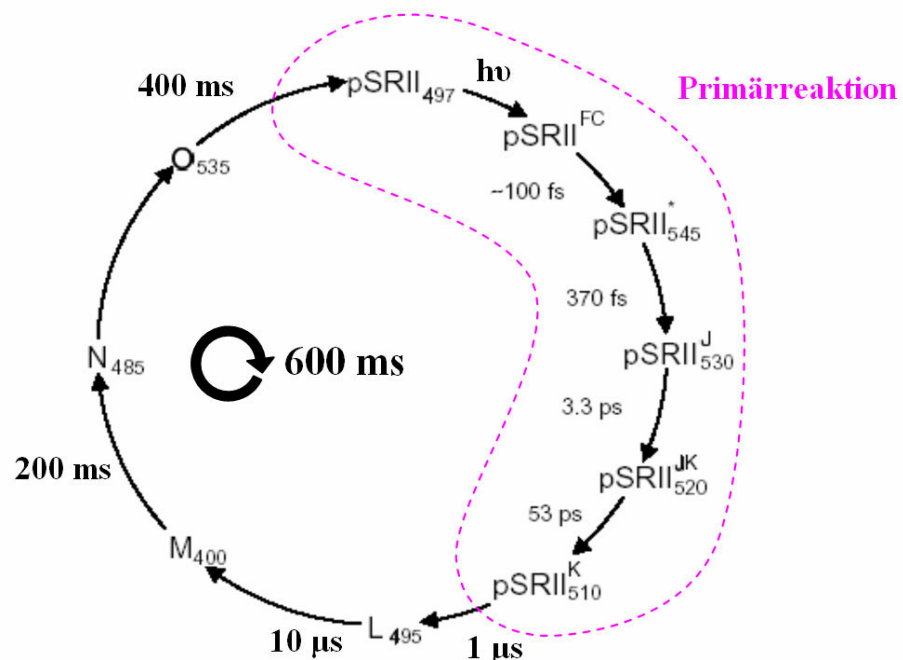
Bei  $1544 \text{ cm}^{-1}$  hat sowohl das 0.11 ps-GF- als auch das 0.1 ps-SVD-Spektrum die Form einer Absorptionsbande. Das kann bedeuten, dass hier sehr schnell eine Bande entsteht, die dann wieder mit 2.3 ps (GF), bzw. 2.6 ps (SVD) zerfällt. Das optische Absorptionsmaximum des  $S_1$  liegt bei ca. 516 nm. Die Bande für die Ethylenstretschwingung läge hierfür bei  $1543 \text{ cm}^{-1}$  [Aton1977]. Es ist somit denkbar, dass man bei  $1543 \text{ cm}^{-1}$  die Entstehung und den Zerfall einer Ethylenstretschwingungsbande im  $S_1$  beobachtet. Das entspräche der Dynamik von  $S_1^{iso}$  (Abb. 4.33).

## ***Photozyklus Sensorrhodopsin***

Während der Primärreaktion führt der Retinalchromophor in Sensorrhodopsin eine all-trans-zu 13-cis-Isomerisierung durch, so dass im K-Zustand der Retinalchromophor in 13-cis-Konfiguration vorliegt, wie statische FTIR-Spektren bei 77 K gezeigt haben [Kandori2001]. Der Photozyklus, der dem von bR ähnelt, dauert sehr lange, nämlich ca. 600 ms [Gellini2000]. Daher können Protonen nur sehr ineffizient über die Zellwand transportiert werden. NpSR-II lässt jedoch Protonen auf der extrazellulären Seite zirkulieren [Sasaki1999]:

Die Schiffsche Base des Retinalchromophors reprotoniert beim Übergang M nach O [Sasaki2000]. Dabei wird ein Proton von der extrazellulären Seite aufgenommen. Dieses Proton wird bei der Deprotonierung der Aminosäure Asp<sub>73</sub> beim Übergang O zum Grundzustand wieder zur extrazellulären Seite abgegeben [Sasaki1999]. Das entspricht in Bezug auf die Deprotonierung und Reprotonierung der Schiffschen Base dem Verhalten von bR. Es ist möglich, dass der Transducer den cytoplasmatischen Kanal des NpSR-II verschließt, so dass die Protonenpumpaktivität gehemmt ist [Sasaki2000]. Bei Htr-I aus SR-I hat man dieses Verhalten beobachtet. In Abb. A.3 ist der gesamte Photozyklus von NpSR-II dargestellt.

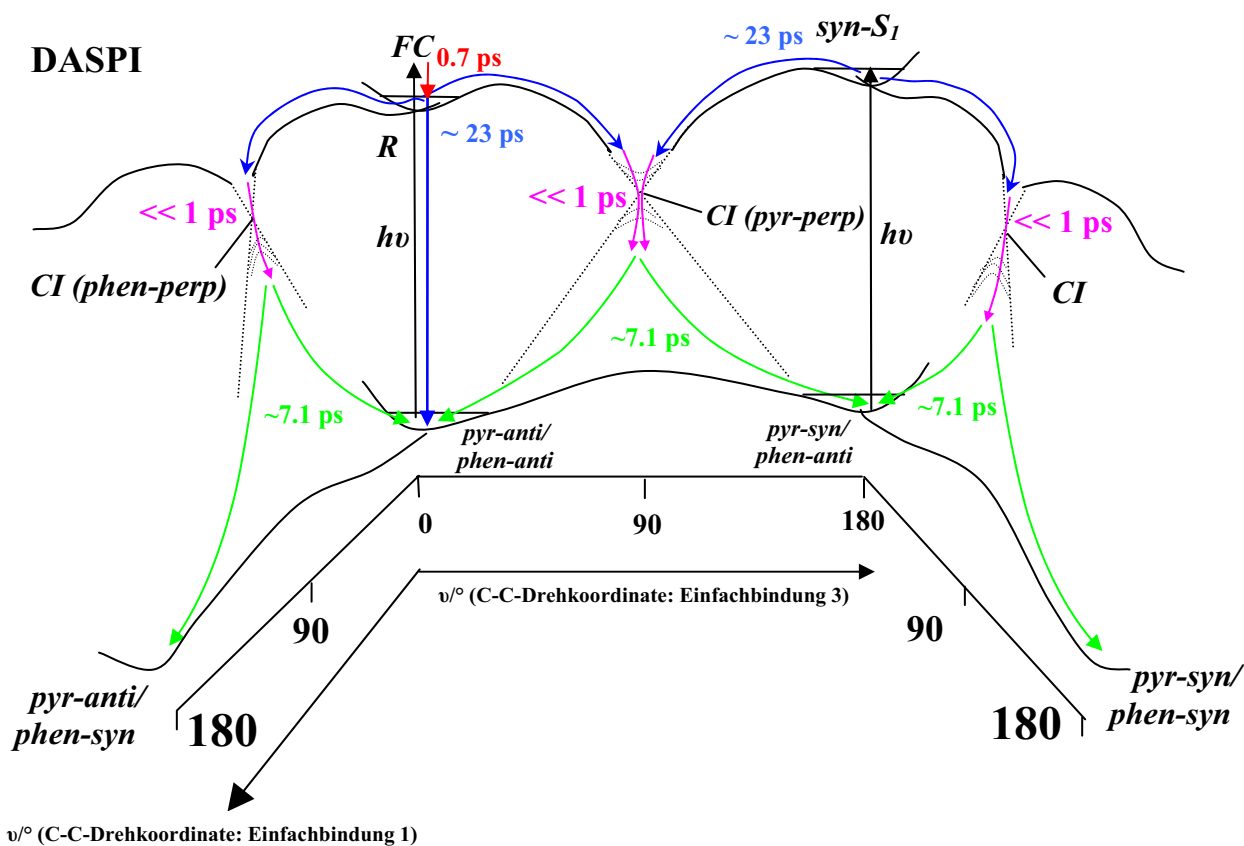
### NpSR-II



**Abbildung A.3:** Photozyklus von NpSR-II [Lutz2001/II]. Die Übergangzeiten ab pSR-II<sub>510</sub> sind [Gellini2000] entnommen. Umrandet ist die Primärreaktion.

## Primärreaktion DASPI

Wenn man beim DASPI während der Photoreaktion Drehungen sowohl der symmetrischen Phenylgruppe um die C-C-Einfachbindung 1 (Abb. 4.88/links/B) als auch der unsymmetrischen Pyridiniumgruppe um die Einfachbindung 3 betrachtet, dann muss ein zweidimensionales Potentialschema zur Photoreaktion aufgestellt werden. In Abb. A.4 ist dieses Schema dargestellt. Es ist eine Verbindung zwischen den Schemata aus Abb. 4.89 und 4.90. Die Koordinaten in Abb. A.4 sind der Drehwinkel um die Einfachbindung 3 (Pyridiniumgruppe) und um die Einfachbindung 1 (symmetrische Phenylgruppe). Die in den GF-Spektren von DASPI (Abb. 4.85) gefundenen Zeitkonstanten 23 ps und 7.1 ps sind als Mittelwerte zu betrachten (7.1 ps Mittelwert der Zeiten für Drehung im  $S_0$  über Phenyl- oder Pyridiniumgruppe, 23 ps als Mittelwerte des Zerfalls von den  $S_1$ -Zuständen  $FC$  und  $syn-S_1$ ).



**Abbildung A.4:** Potentialschema zur Photoreaktion von DASPI. Betrachtet werden Drehungen der symmetrischen Phenylgruppe um die C-C-Einfachbindung 1 (Abb. 4.88/links/B) und der unsymmetrischen Pyridiniumgruppe um die C-C-Einfachbindung 3. Es besteht Identität jeweils zwischen den  $S_0$ -Zuständen  $pyr\text{-}anti/phen\text{-}anti$  und  $pyr\text{-}anti/phen\text{-}syn$  und zwischen  $pyr\text{-}syn/phen\text{-}anti$  und  $pyr\text{-}syn/phen\text{-}syn$ .