

Ultraschnelle Dynamik Protein-gesteuerter  
Reaktionen  
in Bakteriorhodopsin  
und bakteriellem Phytochrom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Freien Universität Berlin  
Fachbereich Physik

*vorgelegt von*

Karsten Heyne

aus Mülheim an der Ruhr

Berlin, 2000

1. *Gutachter* : Prof. D. Stehlik
2. *Gutachter* : Prof. M.P. Heyn

*Tag der mündlichen Prüfung : 13.02.2001*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin . . . . .	5
1.1.1	Photoinduzierte Primärreaktion . . . . .	5
1.1.2	Zielsetzung . . . . .	9
1.2	Der Photorezeptor Phytochrom . . . . .	10
1.2.1	Pflanzliches Phytochrom . . . . .	10
1.2.2	Phytochrom aus <i>Cyanobacterium Synechocystis</i> (Cph1) . .	12
1.2.3	Zielsetzung . . . . .	14
1.3	Ultrakurzzeitspektroskopische Grundlagen . . . . .	14
1.3.1	<i>Pump-Probe</i> Spektroskopie . . . . .	14
1.3.1.1	Inkohärentes Bild . . . . .	15
1.3.1.2	Licht-Materie Wechselwirkung . . . . .	16
1.3.1.3	Kohärentes Bild . . . . .	17
1.3.2	Erzeugung von Lichtimpulsen durch nichtlineare Prozesse 2. Ordnung . . . . .	18
1.3.2.1	SHG- und SFG-Prozess . . . . .	19
1.3.2.2	OPA- und DFG-Prozess . . . . .	21
1.3.3	Erzeugung von Lichtimpulsen durch nichtlineare Prozesse höherer Ordnung . . . . .	21
1.3.3.1	Selbst-Phasen-Modulation (SPM) . . . . .	22
1.3.4	Frequenzmodulierte Lichtimpulse ( <i>Chirp</i> ) . . . . .	25

<b>2</b>	<b>Experimentelle Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	Einleitung . . . . .	27
2.2	Lasersystem . . . . .	27
2.3	VIS-VIS-Spektroskopie . . . . .	28
2.3.1	Weißlicht-Weißlicht-Aufbau . . . . .	28
2.3.2	NOPA-NOPA-Aufbau . . . . .	32
2.3.3	NOPA-Weißlicht-Aufbau . . . . .	39
2.3.4	NOPA . . . . .	41
2.4	VIS-IR-Spektroskopie . . . . .	46
2.4.1	TOPAS . . . . .	46
2.4.2	TOPAS und OPA zur IR-Erzeugung . . . . .	49
2.4.3	VIS-IR-Aufbau . . . . .	52
2.5	Signaldetektion und Signalverarbeitung . . . . .	54
2.5.1	Einkanaldetektion . . . . .	54
2.5.2	Einzelchußnormierung . . . . .	54
2.5.3	Vielkanaldetektion . . . . .	57
2.5.3.1	Konzept der Datenaufnahme . . . . .	57
2.5.3.2	Datenaufnahmeprogramm adc auf dem Alpha-PC	64
2.5.3.3	Messprogramm DC auf dem NT-PC . . . . .	67
2.6	Charakterisierung der Lichtimpulse . . . . .	70
2.6.1	Pulsdiagnostik . . . . .	70
2.6.2	Nichtlineare Effekte in der Messung . . . . .	75
2.7	Probenpräparation . . . . .	76
2.7.1	Bakteriorhodopsin . . . . .	76
2.7.2	Phytochrom aus <i>Cyanobacterium Synechocystis</i> . . . . .	77
2.7.3	Haferphytochrom und PCB . . . . .	77
2.8	Probenhalter . . . . .	77
2.9	Zusammenfassung . . . . .	78

<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>81</b>
3.1	Steuerung der Primärreaktion von bR . . . . .	81
3.1.1	Ergebnisse an bR wt und bR Mutanten . . . . .	81
3.1.1.1	Kinetiken . . . . .	81
3.1.1.2	Differenzspektren . . . . .	82
3.1.1.3	Doppelmutante R82A/G231C . . . . .	84
3.1.1.4	Systematischer Vergleich verschiedener Einflüsse . . . . .	85
3.1.1.5	Purpurne und blaue Formen . . . . .	89
3.1.2	Diskussion . . . . .	91
3.1.2.1	Wechselwirkung zwischen Retinalisomerisierung und äußeren Ladungen . . . . .	91
3.1.2.2	Doppelmutante R82A/G231C . . . . .	91
3.1.2.3	Mechanismus der molekularen Umordnung in der Doppelmutante . . . . .	92
3.1.2.4	R82C-Hg <sup>+</sup> . . . . .	93
3.1.2.5	Biphasische Dynamik . . . . .	93
3.1.3	Zusammenfassung . . . . .	94
3.2	Dynamik der Primärreaktion von Cph1-PEB . . . . .	96
3.2.1	Einführung . . . . .	96
3.2.2	Ergebnisse . . . . .	96
3.2.3	Zusammenfassung von Cph1-PEB . . . . .	104
3.3	Dynamik der Primärreaktion von Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	105
3.3.1	Einführung . . . . .	105
3.3.2	Anregung bei 650 nm . . . . .	105
3.3.2.1	ps-Zeitbereich . . . . .	105
3.3.2.2	Zusammenfassung ps-Zeitbereich . . . . .	121
3.3.2.3	fs-Zeitbereich . . . . .	123

3.3.2.4	Zusammenfassung fs-Zeitbereich . . . . .	127
3.3.3	Anregung bei 615 nm . . . . .	128
3.3.3.1	ps-Zeitbereich . . . . .	128
3.3.3.2	Zusammenfassung ps-Zeitbereich . . . . .	135
3.3.3.3	fs-Zeitbereich . . . . .	136
3.3.3.4	Zusammenfassung fs-Zeitbereich . . . . .	138
3.3.4	Angeregter Zustand und Photoprodukt . . . . .	139
3.3.4.1	Zusammenfassung . . . . .	142
3.3.5	Anregung bei 390 nm . . . . .	143
3.3.6	Diskussion der Ergebnisse an Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	144
3.3.6.1	Einführung . . . . .	144
3.3.6.2	Modell der Primärreaktion von Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	144
3.3.6.3	Vergleich mit Haferphytochrom $P_r$ . . . . .	149
3.3.6.4	Zusammenfassung von Cph1-PCB in der $P_r$ Form . . . . .	152
3.4	Primärreaktion von Cph1-PCB in der $P_{fr}$ -Form . . . . .	154
3.4.1	Ergebnisse . . . . .	154
3.4.2	Modell . . . . .	154
3.5	Zusammenfassung von Cph1-PCB in der $P_{fr}$ und $P_r$ Form . . . . .	156
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>159</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>163</b>
A.1	Biologische Grundlagen . . . . .	163
A.2	Physikalische Grundlagen . . . . .	166
A.2.1	Kohärente Wellenpaketdynamik . . . . .	166
A.2.2	Fehleranalyse . . . . .	168
A.2.3	Apparatives . . . . .	169
A.3	Ergänzungen zur Auswertung . . . . .	170

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	vii
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>185</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>191</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>193</b>
<b>Publikationen</b>	<b>201</b>
<b>Danksagung</b>	<b>203</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>205</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ADC	Analog-Digital Converter, Analog-Digital-Wandler
AS	Aminosäure
BBO	beta-Bariumborat
bR	Bakteriorhodopsin
C-	Kohlenstoff-
Cph1	bakterielles Phytochrom aus <i>Cyanobacterium Synechocystis</i>
D85	Asparaginsäureseitenkette an Position 85 in der AS-Sequenz
D212	Asparaginsäureseitenkette an Position 212 in der AS-Sequenz
DFG	Difference Frequency Generation
ESA	excited electronic state absorption ; Absorption des elektronisch angeregten Zustandes
Exp.-Fit	Fit mit Exponentialfunktion(en) als Fitfunktion
FPPG	Four Photon Parametric Generation
FFT	Fast Fourier Transformation
fs	Femtosekunden ( $10^{-15}$ s)
FT	Fourier Transformation
G231	Glutaminseitenkette an Position 231 in der AS-Sequenz
GA	Grundzustandsabsorption des Ausgangszustandes
His	Histidin
HOOP	Hydrogen out of plane vibration
IR	Licht im infraroten Spektralbereich
NOPA	Non collinear Optical Parametric Amplifier
OD	Optische Dichte
OPA	Optical Parametric Amplification
PCB	Phycocyanobilin
PEB	Phycoerythrobilin
$P_{fr}$	thermisch stabiler elektronischer Grundzustand von bakteriellem Phytochrom
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK	negativer dekadischer Logarithmus der Aciditätskonstante aus dem Massenwirkungsgesetz
ppm	parts per million
$P_r$	thermisch stabiler elektronischer Grundzustand von bakteriellem Phytochrom
PΦB	Phytochromobilin



ps	Pikosekunden ( $10^{-12}$ s)
R82	Argininseitenkette an Position 82 in der AS-Sequenz
R82A	Argininmutante bei der an Position 82 Arginin gegen Alanin ausgetauscht wurde
RR	Resonanz Raman
SE	Stimulierte Emission
SFG	Sum Frequency Generation
SHG	Second Harmonic Generation
SPM	Self Phase Modulation
TiSa	Titan-Saphir
TEA	Triethylamin
THG	Third Harmonic Generation
VIS	Licht im sichtbaren Spektralbereich
Verteilungs.-Fit	Fit mit einer Verteilungsfunktion (Verteilung von Exponentialfunktionen) als Fitfunktion
wt	Wild Typ
XPM	Kreuzphasenmodulation (Cross Phase Modulation)
ZAS	Zerfallsassoziierte Spektren



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Modellbild bR . . . . .	5
1.2	statisches bR Absorptionsspektrum . . . . .	6
1.3	bR Retinalchromophor . . . . .	7
1.4	bR Bindungstasche . . . . .	8
1.5	Chromophorstrukturen in den Cph1-PCB $P_r$ und $P_{fr}$ Formen . . .	11
1.6	Statisches Absorptionsspektrum von Cph1-PCB $P_r$ und $P_{fr}$ . . .	13
1.7	Dargestellt ist die Abhängigkeit der parametrischen Intensität des erzeugten Feldes von der Wellenzahlvektordifferenz $\Delta\vec{k}$ und der effektiven Kristalllänge L. . . . .	20
1.8	Intensität und Ableitung eines Gaußpulses zur Erläuterung der SPM	23
1.9	Experimentell aufgenommene Superkontinuumspektren . . . . .	24
1.10	Positiver <i>Chirp</i> eines Lichtimpulses . . . . .	25
2.1	Weißlicht-Weißlicht <i>Pump-Probe</i> -Versuchsaufbau . . . . .	29
2.2	Weißlicht-Weißlicht Kreuzkorrelation . . . . .	31
2.3	NOPA-NOPA <i>Pump-Probe</i> -Versuchsaufbau . . . . .	33
2.4	Kerrsignal aus den NOPA-NOPA Messungen . . . . .	36
2.5	Testmessung an Oxazine 1 in Methanol . . . . .	37
2.6	NOPA-Weißlicht <i>Pump-Probe</i> Versuchsaufbau . . . . .	40
2.7	NOPA-Strahlverlauf im Kristall . . . . .	42
2.8	Photo des NOPA- <i>Outputs</i> nach dem nichtlinearen Kristall . . . . .	44

2.9	TOPAS . . . . .	46
2.10	Spektrum eines IR-Lichtimpulses . . . . .	49
2.11	OPA zur Erzeugung von IR-Lichtimpulsen . . . . .	50
2.12	VIS- <i>Pump</i> -IR- <i>Probe</i> Aufbau . . . . .	53
2.13	Messablauf eines Messpunktes in der Vielkanaldetektion . . . . .	59
2.14	Messablauf der Vielkanaldetektion . . . . .	62
2.15	Kanalauswahl in DC . . . . .	68
2.16	Fensterauswahl im Programm DC . . . . .	68
2.17	Das Programm DC in Aktion . . . . .	69
2.18	Vergleich von Kreuzkorrelations- und Kerr <i>gating</i> messungen . . . . .	71
2.19	Typisches FROG-Spektrum des NOPA-NOPA Aufbaus . . . . .	73
2.20	FROG-Spektrum von sehr kurzen Lichtimpulsen aus dem NOPA-NOPA Aufbau . . . . .	74
2.21	Kohärentes "Artefakt" in den Messungen . . . . .	75
3.1	Kinetiken von bR und Mutanten . . . . .	83
3.2	Differenzspektren von bR und Mutanten . . . . .	84
3.3	Kinetiken von bR und R82A bei verschiedenem pH . . . . .	85
3.4	Kinetiken von bR wt und R82C- <i>Hg</i> <sup>+</sup> mit positiver Ladung in Position 82 . . . . .	86
3.5	Kinetiken von bR wt mit Beiträgen vom N-Intermediat . . . . .	87
3.6	Kinetiken von Cph1-PEB gemessen bei 580 nm Anregung . . . . .	97
3.7	$\chi^2_{min}$ -Kurven eines 1 Exp.-Fit der Kinetiken von Cph1-PEB . . . . .	98
3.8	Differenzspektrum und spektrale Komponenten von Cph1-PEB . . . . .	99
3.9	Kurzzeitbereich von Cph1-PEB -Kinetiken . . . . .	101
3.10	Kurzzeitbereich der Cph1-PEB Kinetiken bei 580 nm . . . . .	102
3.11	Oszillationsfrequenzen in den PEB Kinetiken . . . . .	103
3.12	Verteilung von Ratenkonstanten . . . . .	107

3.13 Kinetiken von Cph1-PCB $P_r$ aus Weißlicht-Weißlicht Messungen bei unterschiedlichen Abtastwellenlängen . . . . .	108
3.14 Differenzspektren von Cph1-PCB $P_r$ aus Weißlicht-Weißlicht Messungen ; $\lambda_{anr.} = 670nm$ . . . . .	109
3.15 Vergleich verschiedener Fits von Cph1-PCB $P_r$ bei 680 nm Abtastwellenlänge aus Weißlicht-Weißlicht Messungen . . . . .	111
3.16 Kinetiken von Cph1-PCB $P_r$ bei 650 nm Anregung aus NOPA-Weißlicht Messungen . . . . .	112
3.17 Differenzspektren von Cph1-PCB $P_r$ bei 650 nm Anregung aus NOPA-Weißlicht Messungen . . . . .	112
3.18 Mittelwert der Residuen von Cph1-PCB $P_r$ angeregt bei 650 nm aus NOPA-Weißlicht Messungen für verschiedenen Fitfunktionen.	113
3.19 Zerfallsassoziierte Spektren verschiedener Fitfunktionen von Cph1-PCB $P_r$ angeregt bei 650 nm aus NOPA-Weißlicht Messungen . .	114
3.20 Kinetikvergleich von Cph1-PCB $P_r$ in verschiedenen Messaufbauten	115
3.21 Beispielkinetik von Cph1-PCB $P_r$ mit Fits und Residuen . . . . .	116
3.22 $\chi^2_{min}$ -Oberfläche der Summe der Verteilungsfits; Cph1-PCB $P_r$ ; $\lambda_{anr.} = 650 nm$ . . . . .	119
3.23 $\chi^2_{min}$ -Kurven für 2 Exp.-Fit und Verteilungsfit von Cph1-PCB $P_r$ ; $\lambda_{anr.} = 650nm$ . . . . .	120
3.24 Kinetikvergleich mit verschieden <i>gechirpten</i> Abtastimpulsen; Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	124
3.25 Kinetiken im fs-Zeitbereich von Cph1-PCB $P_r$ , $\lambda_{anr.} = 650 nm$ .	125
3.26 Kinetiken im fs-Zeitbereich von Cph1-PCB $P_r$ , $\lambda_{anr.} = 650 nm$ .	126
3.27 Summe der Fourierspektrum von Cph1-PCB $P_r$ ; $\lambda_{anr.} = 650 nm$ .	127
3.28 Zeitabhängige Absorptionsdifferenzsignale von Cph1-PCB $P_r$ bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 615nm$ . . . . .	129
3.29 Absorptionsdifferenzspektren von Cph1-PCB $P_r$ angeregt bei 615nm	130
3.30 Mittelwerte der Residuen verschiedener Fitfunktionen; Anregung von Cph1-PCB $P_r$ bei 615nm. . . . .	131

3.31 Zerfallsassoziierten Spektren von globalen Fits. Anregung von Cph1-PCB $P_r$ bei 615nm. . . . .	132
3.32 Spur der minimalen $\chi^2$ -Werte aus der <i>exhaustive search</i> Analyse. Anregung von Cph1-PCB $P_r$ bei 615nm. . . . .	133
3.33 2-dimensionale <i>exhaustive search</i> Analyse für einen globalen Fit mit einer Verteilung von Exponentialfunktionen. Anregung von Cph1-PCB $P_r$ bei 615nm. . . . .	134
3.34 Kinetiken im fs-Zeitbereich , $\lambda_{anr.} = 615$ nm . . . . .	137
3.35 Summe der Fourierspektrum; $\lambda_{anr.} = 615$ nm. . . . .	138
3.36 Vergleich des ersten Photoproduktes und des angeregten Zustandes bei Anregungen von 615nm und 650nm . . . . .	140
3.37 Vergleich der Kinetiken bei 680nm bei Anregungen von 395nm und 670nm . . . . .	143
3.38 Skizze: Potentialschema für die Primärreaktion von Cph1-PCB $P_r$	145
3.39 Kinetiken von Cph1-PCB $P_{fr}$ bei Anregung bei 727 nm . . . . .	155
A.1 Ausgewählte Aminosäuren . . . . .	163
A.2 Chromophorstrukturen in den Haferphytochrom $P_r$ und Cph1-PEB . . . . .	164
A.3 Zerlegung der Grundzustandsabsorption von Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	165
A.4 Vergleich des Cph1-PCB $P_r$ Spektrums während der Messung . . . . .	165
A.5 FT-Spektrum von Oxazine 1 in Methanol . . . . .	167
A.6 Küvettenhalter . . . . .	169
A.7 Antwort der Leerküvette bei verschiedenen Wellenlängen . . . . .	170
A.8 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten für verschiedene Fitfunktionen; $\lambda_{anr.} = 650$ nm. . . . .	171
A.9 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten für verschiedene Fitfunktionen; $\lambda_{anr.} = 650$ nm. . . . .	171
A.10 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten für verschiedene Fitfunktionen; $\lambda_{anr.} = 650$ nm. . . . .	172

A.11 ZAS eines 2 Exp.-Fits zu unterschiedlichen Zerfallszeitpaaren; $\lambda_{anr.} = 650 \text{ nm}$ . . . . .	172
A.12 2 dimensionale <i>Exhaustive Search</i> Analyse für einen 2 Exp.-Fit von Cph1-PCB $P_r$ ; $\lambda_{anr.} = 650 \text{ nm}$ . . . . .	173
A.13 Fourierspektrum des Residuums der 690 nm Kinetik Cph1-PCB $P_r$ ; $\lambda_{anr.} = 650 \text{ nm}$ . . . . .	173
A.14 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und des Fits mit einer Exponentialfunktion; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	174
A.15 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und des Fits mit einer Exponentialfunktion; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	174
A.16 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und des Fits mit einer Exponentialfunktion; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	175
A.17 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und des Fits mit einer Exponentialfunktion; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	175
A.18 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und Fits mit verschiedenen Fitfunktionen; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	176
A.19 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und Fits mit verschiedenen Fitfunktionen; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	176
A.20 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und Fits mit verschiedenen Fitfunktionen; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	177
A.21 Residuen der Cph1-PCB $P_r$ Daten und Fits mit verschiedenen Fitfunktionen; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$ . . . . .	177
A.22 Vergleich verschiedener zerfallsassoziierter Spektren aus den globalen 2 Exp.Fits. Cph1-PCB $P_r$ wurde bei 615 nm angeregt. . . . .	178
A.23 2-dimensionale <i>exhaustive search</i> Analyse für einen globalen 2 Exp.-Fits. Anregung von Cph1-PCB $P_r$ bei 615nm. . . . .	178
A.24 Vergleich der Absorptionsdifferenzspektren bei Anregung von 615 nm und 650 nm in Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	179
A.25 Vergleich der ESA Spektren von Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	179
A.26 Vergleich der lumi-R Spektren von Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	180
A.27 Kinetik von PCB in Methanol bei 640 nm . . . . .	180

A.28 Kinetik von PCB in Methanol bei 640 nm und 470 nm . . . . .	181
A.29 Vergleich der 3 ps Komponenten in PCB, Cph1-PCB $P_r$ und Ha- ferphytochrom $P_r$ . . . . .	182
A.30 FT-Spektrum von Haferphytochrom $P_r$ . . . . .	182
A.31 Vergleich der Verteilungsfunktionen $f(k)$ . . . . .	183



# Tabellenverzeichnis

3.1	Purpurne bR Formen . . . . .	82
3.2	Blaue bR Formen . . . . .	87
3.3	pH Abhängigkeit der bR Kinetiken der purpurnen Form . . . . .	88
3.4	Auflistung der Fitergebnisse für Cph1-PCB $P_r$ bei Anregung in der Hauptabsorptionsbande . . . . .	118
3.5	Mittelwerte der Fitergebnisse von Cph1-PCB $P_r$ bei 650 nm Anregung . . . . .	121
3.6	Vergleich der Fitergebnisse für unterschiedliche Fitfunktionen bei 615nm Anregung von Cph1-PCB $P_r$ . . . . .	135
3.7	Vergleich der Absorptionsdifferenzspektren bei Anregung von 615 nm und 650 nm . . . . .	151



# Literaturverzeichnis

- [1] M.C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, and D. Oesterhelt. *Chem. Phys. Lett.*, 117:1, 1985.
- [2] R.A. Mathies, C.H. Brito Cruz, T.W. Pollard, and C.V. Shank. *Science*, 240:777, 1988.
- [3] P. Hamm, M. Zurek, T. Röschinger, H. Patzelt, D. Oesterhelt, and W. Zinth. *Chem. Phys. Lett.*, 263:613, 1996.
- [4] G. Schneider, R. Diller, and M. Stockburger. *Chem. Phys.*, 131:17, 1989.
- [5] R. Govindjee, S.P. Balashov, and T.G. Ebrey. *Biophys. J.*, 58:597, 1990.
- [6] A. Xie. *Biophys. J.*, 58:1127, 1990.
- [7] T. Kobayashi, M. Terauchi, T. Kouyama, M. Yoshizawa, and M. Taiji. *SPIE Laser Appl. Life Sci.*, 1403:407, 1990.
- [8] L. Song, M.A. El-Sayed, and J.K. Lanyi. *Science*, 261:891, 1993.
- [9] For reviews about retinal proteins see: *Isr. J. Chem.*, 35:3, 1995.
- [10] M.P. Heyn, B. Borucki, and H. Otto. *in press*, 2000.
- [11] V.A. Sineshchekov. *Biochim. Biophys. Acta*, 1228:1254, 1995.
- [12] R. Diller. *Chem. Phys. Lett.*, 295:47, 1998.
- [13] R. Dziewior, K. Romey, and R. Diller. *Laser Chem.*, 19:173, 1999.
- [14] W. Behrens et al. private communication.
- [15] N. Grigorieff, T.A. Ceska, K.H. Downing, J.M. Baldwin, and R. Henderson. *J. Mol. Biol.*, 259:393, 1996.

- [16] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius. *Nature New Biol.*, 233:149, 1971.
- [17] W. Stoeckenius and R. Bogomolni. *A. Annu. Rev. Biochemistry*, 21:587, 1982.
- [18] T.G. Ebrey. *Thermodynamics of Membrane Receptors and Channels*. CRC Press: Boca Raton, FL, 1993.
- [19] S.J. Doig, P.J. Reid, and R.A. Mathies. *J. Phys. Chem*, 95:6372, 1991.
- [20] T.L. Brack and G.H. Atkinson. *J. Phys. Chem*, 95:2351, 1991.
- [21] R. Diller, S. Maiti, G.C. Walker, B.R. Cowen, R. Pippenger, R.A. Bogomolni, and R.M. Hochstrasser. *Chem. Phys. Lett.*, 241:109, 1995.
- [22] B. Aton, A.G. Doukas, R.H. Callendar, B. Becher, and T.G. Ebrey. *Biochemistry*, 16:2995, 1977.
- [23] M. Stockburger, W. Klusmann, H. Gattermann, G. Massig, and R. Peters. *Biochemistry*, 18:4886, 1979.
- [24] S.P.A. Fodor, J.B. Ames, R. Gebhard, E.M.M. van den Berg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg, and R.A. Mathies. *Biochemistry*, 27:7097, 1988.
- [25] J.K. Lanyi. *J. Phys. Chem. B*, 104 No. 48:11441, 2000.
- [26] S. Moltke, I. Wallat, N. Sakai, K. Nakanishi, M.F. Brown, and M.P. Heyn. *Biochemistry*, 38:11762, 1999.
- [27] K.C. Hasson, F. Gai, and P.A. Anfinsen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:15124, 1996.
- [28] G. Haran, K. Wynne, A. Xie, Q. He, M. Chance, and R.M. Hochstrasser. *Chem. Phys. Lett.*, 261:389, 1996.
- [29] Q. Zhong, S. Ruhmann, M. Ottolenghi, M. Sheves, N. Friedman, G.H. Atkinson, and J.K. Delaney. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:12828, 1996.
- [30] L. Song and M.A. El-Sayed. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:8889, 1998.
- [31] L. Ujj, Y. Zhou, M. Sheves, M. Ottolenghi, S. Ruhmann, and G.H. Atkinson. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:96, 2000.
- [32] W. Zinth, A.O. Sieg, P. Huppmann, T. Blankenhorn, M. Nonella, and D. Oesterheldt. *XII Int. Conf. Ultr. Phen.*, technical digest:WA5-1, 2000.

- [33] H. Luecke, H.T. Richter, and J.K. Lanyi. *Science*, 280:1934, 1998.
- [34] F. Andel, J.C. Lagarias, and R.A. Mathies. *Biochemistry*, 35:15997, 1996.
- [35] H. Foerstendorf, E. Mummert, E. Schäfer, H. Scheer, and F. Siebert. *Biochemistry*, 35:10793, 1996.
- [36] C.-F. Zhang, D.L. Farrens, S.C. Björling, P.-S. Song, and D.S. Kliger. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:4569, 1992.
- [37] C. Fankhauser, K.-C. Yeh, J.C. Lagarias, H. Zhang, T.D. Elich, and J. Chory. *Science*, 284:1539, 1999.
- [38] W. Rüdiger and F. Thümmel. *Angew. Chem.*, 103:1242, 1991.
- [39] V.A. Sineshchekov and A.V. Sineshchekov. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 5:197, 1990.
- [40] V.A. Sineshchekov. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 28:53, 1995.
- [41] P. Schmidt, T. Gensch, A. Remberg, W. Gärtner, S.E. Braslavsky, and K. Schaffner. *Photochem. Photobiol.*, 68(5):754, 1998.
- [42] F. Andel, K.C. Hasson, F. Gui, P.A. Anfinrud, and R.A. Mathies. *Biospectroscopy*, 3:421, 1997.
- [43] M. Bischoff. *Femtosekundenspektroskopische Untersuchungen an Phytochromen*. Doktorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena; Biologisch-Pharmazeutische Fakultät. Jena 2000.
- [44] A. Holzwarth, M.G. Müller, I. Martin, W. Schlamann, W. Gärtner, S. Braslavsky, and K. Schaffner. *DFG-Rundgespräch: Spektroskopie an Photorezeptoren*, 1999.
- [45] J. Hughes, T. Lamparter, F. Mittmann, E. Hartmann, W. Gärtner, A. Wilde, and T. Börner. *Nature*, 386:663, 1997.
- [46] T. Lamparter, F. Mittmann, W. Gärtner, T. Börner, E. Hartmann, and J. Hughes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:11792, 1997.
- [47] J. Hughes and T. Lamparter. *Plant Physiol.*, 121:1059, 1999.
- [48] T. Lamparter, B. Esteban, and J. Hughes. *in press*.

- [49] A. Remberg, I. Lindner, T. Lamparter, J. Hughes, C. Kneip, P. Hildebrandt, S.E. Braslavsky, W. Gärtner, and K. Schaffner. *Biochemistry*, 36:13389, 1997.
- [50] H. Foerstendorf, T. Lamparter, J. Hughes, W. Gärtner, and F. Siebert. *Photochem. Photobiol.*, 71(5):655, 2000.
- [51] V. Sineshchekov, J. Hughes, E. Hartmann, and T. Lamparter. *J. Photochem. Photobiol.*, 67(2):263, 1998.
- [52] L. Li and J.C. Lagarias. *J. Biol. Chem.*, 267:192040, 1992.
- [53] Y. R. Shen. *The Principles of Nonlinear Optics*. John Wiley and Sons, Inc., 1984.
- [54] S.A. Kovalenko, A.L. Dobryakov, J. Ruthmann, and N.P. Ernsting. *Phys. Rev. A*, 59 No. 3:2369, March 1999.
- [55] R. W. Boyd. *Nonlinear Optics*. ACADEMIC PRESS, Inc., 1992.
- [56] R.R. Alfano and P.P. Ho. *IEEE J. Quant. Elec.*, 24 No. 2:351, 1988.
- [57] R.R. Alfano. *The Supercontinuum Laser Source*. Springer Verlag, 1989.
- [58] R. Dziewior. *Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie der trans-cis-Isomerisierung in Bakteriorhodopsin*. Doktorarbeit, Freie Universität Berlin, Fachbereich Physik, 1998.
- [59] J.-C. Diels. *Ultrashort laser pulse phenomena*. Academic Press, Inc, 1996.
- [60] S. Engleitner, M. Seel, and W. Zinth. *J. Phys. Chem. A*, 103:3013, 1999.
- [61] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Spörlein, and W. Zinth. *Appl. Phys. B*, 70:1, 2000.
- [62] S. Lochbrunner, T. Wilhelm, J. Piel, S. Spörlein, and E. Riedle. *Advanced Solid-State Lasers*, 26:366, 1999.
- [63] J. Piel, M. Beuter, and E. Riedle. *Opt. Lett.*, 25 No. 3:180, 2000.
- [64] R. Danielius, A. Piskarskas, and A. Stabinis. *J. Opt. Soc. Am. B*, 10 No. 11:2222, November 1993.
- [65] P. Hamm, R.A. Kaindl, and J. Stenger. *in press*, 2000.

- [66] S. Lochbrunner, P. Huppmann, and E. Riedle. *Optics Communications*, submitted.
- [67] R. Trebino and D.J. Kane. *J. Opt. Soc. Am. A*, 10 No. 5:1101, May 1993.
- [68] M. Krebs, R. Mollaaghababa, and H.G. Khorana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:1987, 1993.
- [69] U. Alexiev, R. Mollaaghababa, P. Scherrer, H.G. Khorana, and M.P. Heyn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:372, 1995.
- [70] U. Alexiev et al. private communication.
- [71] M. Bischoff, G. Hermann, S. Rentsch, D. Strehlow, S. Winter, and H. Chosrowjan. *J. Phys. Chem. B*, 104:1810, 2000.
- [72] P. Scherrer and W. Stoeckenius. *Biochemistry*, 24:7733, 1985.
- [73] V. Rosenbach, R. Goldberg C. Gilon, and M. Ottolenghi. *Photochem. Photobiol.*, 36:197, 1982.
- [74] J.H. Hanamoto, P. Dupuis, and M.A. El-Sayed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:7083, 1984.
- [75] K. Romey. *Strukturuntersuchungen mittels stationärer, polarisierter FTIR-Spektroskopie in Transmission und mit ATR an Membranprotein Bakteriorhodopsin*. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, Fachbereich Physik, 1996.
- [76] I. Chizhov, D.S. Chernavsky, M. Engelhard, K.H. Müller, B.V. Zubov, and B. Hess. *Biophysical Journal*, 71:2329, 1996.
- [77] G. Váró and J.K. Lanyi. *Biochemistry*, 30:5008, 1991.
- [78] H. Ohtani and O. Kikuchi. *J. Phys. Chem. B*, 103:8186, 1999.
- [79] W. Humphrey, E. bamberg, and K. Schulten. *Biophys. J.*, 72:1347, 1997.
- [80] A. Warshel, Z.T. Chu, and J.-K. Hwang. *Chem. Phys.*, 158:304, 1991.
- [81] M. Garavelli, P. Celani, F. Bernardi M.A. Robb, and M. Olivucci. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:6891, 1997.
- [82] E. Pebay-Peyroula, G. Rummel, J.P. Rosenbusch, and E.M. Landau. *Science*, 277:1677, 1997.

- [83] U. Alexiev, R. Mollaaghababa, H.G. Khorana, and M.P. Heyn. *J. Biol. Chem.*, 275:13431, 2000.
- [84] L. Brown, G. Váró, M. Hatanaka, J. Sasaki, H. Kandori, A. Maeda, N. Friedman, M. Sheves, R. Needleman, and J. Lanyi. *Biochemistry*, 34:12903, 1995.
- [85] S.L. Logunov, T.M. Masciangioli, and M.A. El-Sayed. *J. Phys. Chem. B*, 102:8109, 1998.
- [86] L. Song, D. Yang, M.A. El-Sayed, and J.K. Lanyi. *J. Phys. Chem.*, 99:10052, 1995.
- [87] H. Kandori, K. Yoshihara, and S. Tokutomi. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10958, 1992.
- [88] T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts, and D. Oesterhelt. *Chem. Phys. Lett.*, 241:559, 1995.
- [89] Peijun Cong, Yi Jing Yan, Hans P. Deuel, and John D. Simon. *J. Chem. Phys.*, 100(11):7855, 1994.
- [90] F. Andel, J.T. Murphy, J.A. Haas, M.T. McDowell, I. van der Hoef, J. Lugtenburg, J.C. Lagarias, and R.A. Mathies. *Biochemistry*, 39:2667, 2000.
- [91] H. Otto, B. Borucki, and M.P. Heyn. private communication.
- [92] S. Lochbrunner, A.J. Wurzer, and E. Riedle. *J. Chem. Phys.*, 112 No. 24:10699, 2000.
- [93] P. Deuffhard and A. Hohmann. *Numerische Mathematik I : Eine algorithmisch orientierte Einführung*. de Gruyter, 1993.
- [94] J.G. McWhirter and E.R. Pike. *J. Phys. A: Math. Gen.*, 11 No. 9:1729, 1978.
- [95] B. Borucki et al. *Daten aus ns bis s Absorptionsdifferenzmessungen an Cph1-PCB*. private communication.
- [96] T.A. Roelofs. *Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an Cph1-PCB in der P<sub>r</sub> Form*. private communication.



- [97] D. Strehlow. *Die primären Photoprozesse im Phycocyanobilin und Phytochrom - Ergebnisse einer vergleichenden Untersuchung*. Doktorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena; Biologisch-Pharmazeutische Fakultät.
- [98] J. Matysik, P. Hildebrandt, W. Schlamann, S.E. Braslavsky, and K. Schaffner. *Biochemistry*, 34:10497, 1995.
- [99] S. Rentsch, G. Hermann, M. Bischoff, D. Strehlow, and M. Rentsch. *Photochem. Photobiol.*, 66(5):585, 1997.
- [100] R. Büchler, G. Hermann, D.V. Lap, and S. Rentsch. *Chem. Phys. Lett.*, 233:514, 1995.
- [101] G. Hermann, M.E. Lippitsch, H. Brunner, F.R. Aussenegg, and E. Müller. *Photochem. Photobiol.*, 52 No. 1:13, 1990.
- [102] A. Holzwarth, J. Wendler, B.P. Ruzsicska, S.E. Braslavsky, and K. Schaffner. *Biochimica et Biophysica Acta*, 791:265, 1984.
- [103] A. Holzwarth, E. Venuti, S.E. Braslavsky, and K. Schaffner. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1140:59, 1992.
- [104] M. Bischoff, G. Hermann, S. Rentsch, and D. Strehlow. *J. Phys. Chem. A*, 102:4399, 1998.
- [105] S. Rentsch, M. Bischoff, G. Hermann, and D. Strehlow. *Appl. Phys. B*, 66:259, 1998.
- [106] A. Shirakawa, I. Sakane, and T. Kobayashi. PhD thesis, CLEO, 1998.
- [107] L. Xu, N. Nakagawa, R. Morita, and M. Yamashita. *Ultrafast Phenomena X*, 2000.
- [108] M. Seel, S. Engleitner, and W. Zinth. *Chem. Phys. Lett.*, 275:363, 1997.
- [109] T.A. Roelofs, C-H. Lee, and A.R. Holzwarth. *Biophys. J.*, 61:1147, 1992.



# Publikationen

## Veröffentlichungen

Wesentliche Bestandteile der Arbeit zur Steuerung der Primärreaktion in Bakteriorhodopsin sind in

- K. Heyne, J. Herbst, B. Dominguez-Herradon, U. Alexiev und R. Diller. Reaction Control in Bakteriorhodopsin: Impact of Arg82 and Asp85 on the Fast Retinal Isomerization, Studied in Arg82Ala/Gly231Cys and Various Purple and Blue Forms of Bakteriorhodopsin. *Journal of Physical Chemistry B*, **104**, 6053 (2000).
- K. Heyne, R. Dziewior, R. Diller und U. Alexiev. Single and Double Mutants of Bakteriorhodopsin and their Impact on Photoisomerization. Ultrafast Phenomena XI, Eds.: T. Elsaesser, J.G. Fujimoto, D.A. Wiersma and W. Zinth, Springer Verlag 1998, Seite 681.

veröffentlicht worden.

Eine Veröffentlichung der Ergebnisse an bakteriellem Phytochrom

- K. Heyne et al. Ultrafast Dynamics of Phytochrome from *Cyanobacterium Synechocystis*, reconstituted with Phycocyanobilin (Cph1-PCB) and Phycoerythrobilin (Cph1-PEB). *Biophysical Journal*.

wird gerade vorbereitet.

- R. Dziewior, K. Romey und R. Diller. Femtosecond time resolved infrared spectroscopy of the ethylenic stretch vibration during the all-trans to 13-cis isomerization of bakteriorhodopsin. *Laser Chem.*, **19**, 173 (1999)

## Vorträge

- K. Heyne, J. Herbst, B. Dominguez-Herradon, U. Alexiev und R. Diller. Impact of specific single and double mutants on the primary isomerization reaction in bacteriorhodopsin. 8<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology, Granada, Spain 3-8 September 1999.
- K. Heyne, R. Diller, T.A. Roelofs, D. Stehlik, B. Esteban, J. Hughes und T. Lamparter. Phytochrom aus Cyanobakterien, rekonstituiert mit Phycocyanobilin (PCB-Cph1). Erste Resultate von optischen Kurzzeitmessungen. DFG/MPG - Rundgespräch "Spektroskopie an Photorezeptoren", Schloss Landsberg, Oktober 1999.

## Poster

- K. Heyne, J. Herbst, D. Stehlik, R. Diller, B. Esteban, T. Lamparter und J. Hughes. Ultrafast Dynamics of Phytochrome from *Cyanobacterium Synecchocystis*, reconstituted with Phycocyanobilin (PCB-Cph1) and Phycoerythrobilin (PEB-Cph1). First General Meeting of the ULTRA PROGRAMME (European Science Foundations), Coimbra 2000.
- K. Heyne, J. Herbst, R. Diller, T.A. Roelofs, D. Stehlik, J. Hughes und T. Lamparter. Optische Kurzzeitmessungen an Phytochrom aus Cyanobakterien. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Potsdam 2000.
- K. Heyne, J. Herbst, B. Dominguez-Herradon, R. Diller und U. Alexiev. Einfluß spezieller Einfach- und Doppelmutanten auf die Primärreaktion in Bakteriorhodopsin. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Heidelberg 1999.
- J. Herbst, K. Heyne, B. Dominguez-Herradon, U. Alexiev und R. Diller. pH-Abhängigkeit der ultraschnellen trans-cis Isomerisierung von Bakteriorhodopsin. Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, Heidelberg 1999.

# Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. D. Stehlik und Rolf Diller bedanken, die mich unterstützt und mir große Freiheiten gelassen haben, meine Interessensschwerpunkte in dem faszinierenden Gebiet der Ultrakurzzeitspektroskopie an biologischen Systemen zu verfolgen. Rolf Diller sei im Besonderen für die wissenschaftliche Begleitung und fruchtbaren Diskussionen gedankt.

Ich danke Johannes Herbst für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und wünsche ihm weiterhin viel Erfolg. Außerdem danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Stehlik / Prof. Vieth: Ingo, Martin, Theo, Stefan, Frank, Peizu, Roswitha, Sabine und allen anderen, die hier nicht aufgezählt sind, für die gute Arbeitatmosphäre und die Bereitschaft immer zu helfen, wenn es nötig und möglich war.

Durch die gute Zusammenarbeit mit der AG Prof. Heyn konnten die Messungen an Bakteriorhodopsin und Mutanten durchgeführt werden. Einen großen Anteil an der erfolgreichen Zusammenarbeit hatte Ulrike Alexiev, die nicht nur die Präparation der bR-Proben geleitet hat, sondern stets mit Ihren Ideen und Anregungen wichtige Impulse für meine Arbeit lieferte. Prof. M.P. Heyn sei gedankt für die Unterstützung und sein Interesse an unserer Forschung und meiner Doktorarbeit; Barbara Dominguez-Herradon für die oft mühselige Präparation der bR-Proben und Ingrid Wallat für die Präparation von bR5.12, an dem Testmessungen erfolgreich durchgeführt werden konnten. Außerdem danke ich Harald Otto und Berthold Borucki für die freundliche Bereitstellung ihrer Messergebnisse an bakteriellem Phytochrom, welche mir als Vergleich dienten.

Jon Hughes, Tilmann Lamparter und Berta Esteban (FB Biologie) möchte ich für die interdisziplinäre Zusammenarbeit und die Präparation der Cph1 Proben (bakterielles Phytochrom) danken. Ihre Kompetenz in Fragestellungen zu Phytochrom hat mein Verständnis der Funktion und Bedeutung von Phytochrom vertieft und ich hoffe, dass die gute Zusammenarbeit genauso erfolgreich wie bisher fortgeführt werden kann.

Die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Priv. Doz. G. Hermann von der Friedrich-Schiller Universität Jena hat aufgrund des großen Interesses von Priv. Doz. G. Hermann, Dietmar Strehlow und Mark Bischoff viel zur Interpretation und Diskussion der Ergebnisse in Phytochrom beigetragen. Die Messungen an PCB in Lösung und Haferphytochrom, die ich mit Dietmar an den von ihm präparierten Proben durchgeführt habe, haben das Bild der Photoreaktion erweitert.

Prof. Holzwarth vom MPI in Mülheim an der Ruhr danke ich für die Anregungen zur kritischen Diskussion der Messergebnisse an Phytochrom.

Prof. V. Sinechekov von der M.V. Lomonosov Moscow State University danke ich für den anhaltenden Gedankenaustausch - auch per E-mail - über Fragen der Fluoreszenz und Heterogenität in Phytochrom.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe Prof. N. Schwentner für das gute Arbeitsklima im Labor und für die erfolgreiche Kooperation mit Mathias Bargheer und Peter Dietrich vor allem im Bezug auf die NOPA's bedanken.

Peter Hamm vom MBI (Berlin) hat uns wichtige Anregung zur Verbesserung des *VIS-Pump IR-Probe* Aufbaus geliefert.

Karl-Heinz Becker danke ich dafür, dass er uns sofort half, als die Firma, die uns bei den FASTBUS-Systemen unterstützen sollte, in den Konkurs ging.

Harald Knipp danke ich für die Ausführung der Programmierarbeiten am Programm DC.

Dem ehrlichen Finder danke ich, der meinen gestohlenen Rucksack, in dem sich eines meiner Labormessbücher befand, zur Polizei brachte.

Volker Berghof und Stefan Grosse haben mich bei der Einarbeitung und Problembewältigung in LATEX unterstützt.

Die Mitarbeiter der mechanischen Werkstatt, der Elektronik und der TTL-Abteilung, sahen auch außerhalb der Öffnungszeiten meist noch eine Möglichkeit mir zu helfen.

Außerdem danke ich meiner Frau, die mir immer zur Seite stand und mir gerade in schwierigen Situationen half, meine Probleme zu lösen und meinen Schwiegereltern, die mich nicht zuletzt auch finanziell unterstützten.

# Lebenslauf

Karsten Heyne, geb. Romey

geboren am 01.12.69 in Mülheim an der Ruhr

- |             |   |
|-------------|---|
| 1976 - 1980 | Grundschule, Mülheim an der Ruhr  |
| 1980 - 1989 | Gymnasium Broich, Mülheim an der Ruhr<br>Abschluss Abitur                   |
| 1989 - 1990 | Grundwehrdienst   |
| 1990 - 1991 | Beginn des Physikstudiums an der Ruhr-Universität Bochum                    |
| 1991 - 1993 | Fortführung des Physikstudiums an der<br>Philipps-Universität Marburg       |
| 1993 - 1996 | Wechsel zur Freien Universität Berlin<br>Abschluss Diplom (AG Heyn)         |
| 1994 - 1996 | Studentischer Mitarbeiter am FB Physik der FU Berlin                        |
| seit 1996   | Wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG Stehlik<br>am FB Physik der FU Berlin |

Die Arbeit wurde in der neuen deutschen Rechtschreibung verfasst.