

Kapitel 1

Einleitung

Die Forschung in der molekularen Biophysik bringt immer neue Fortschritte und Antworten, die für das Verständnis der mikroskopischen Vorgänge in der Natur notwendig sind und von denen der Mensch und die Technik lernen können. Ein Beispiel ist die Photosynthese, die durch ihren hochoptimierten und reibungsfreien Ablauf eine effiziente Umwandlung von Photonenenergie in chemische Energie schafft, was für die menschliche Technik weiterhin eine große Herausforderung ist. Die Photochemie der ersten Prozesse geschieht auf einer Zeitskala von mehreren Femtosekunden (10^{-15} s) und hat einen entscheidenden Anteil an der hohen Effizienz. Aus der Untersuchung der Photochemie von kleinen wie von großen Molekülen mit gepulster Femtosekunden-Laserstrahlung ist das Forschungsgebiet der Femtochemie entstanden. In einem weiteren wichtigen Beispiel werden die Photochemie, die Femtochemie und die Biophysik vereint: in dem Protein Bakteriorhodopsin (bR) löst die absorbierte Photonenenergie innerhalb von 500 fs eine molekulare Strukturveränderung aus, um eine einfache Art der Photosynthese zu betreiben. Was macht die Prozesse so schnell und effektiv? Eine lichtempfindliche Molekülgruppe (Chromophor [griech:] Farbträger) ist optimal in das Protein eingebettet, so dass die Proteinumgebung seine Photoreaktion katalysiert. Diese primäre Reaktion ist die ultraschnelle trans-cis-Photoisomerisierung des Retinalchromophors. Die Charakterisierung der Isomerisierung ist Gegenstand dieser Arbeit. bR repräsentiert in der Biophysik ein Modellsystem für die Gruppe der Retinalproteine. Alle Retinalproteine verbindet neben dem gleichen Chromophor die gleiche räumliche (tertiäre) Struktur aus sieben α -Helices (Abbildung 1.1) und eine ähnliche Photochemie: Photonen regen den Chromophor elektronisch an und lösen damit die Isomerisierung um eine Doppelbindung aus. Allerdings ist die biologische Funktion der einzelnen Retinalproteine unterschiedlich: Das Rhodopsin dient als Sehpigment, das Halorhodopsin als Chloridpumpe,

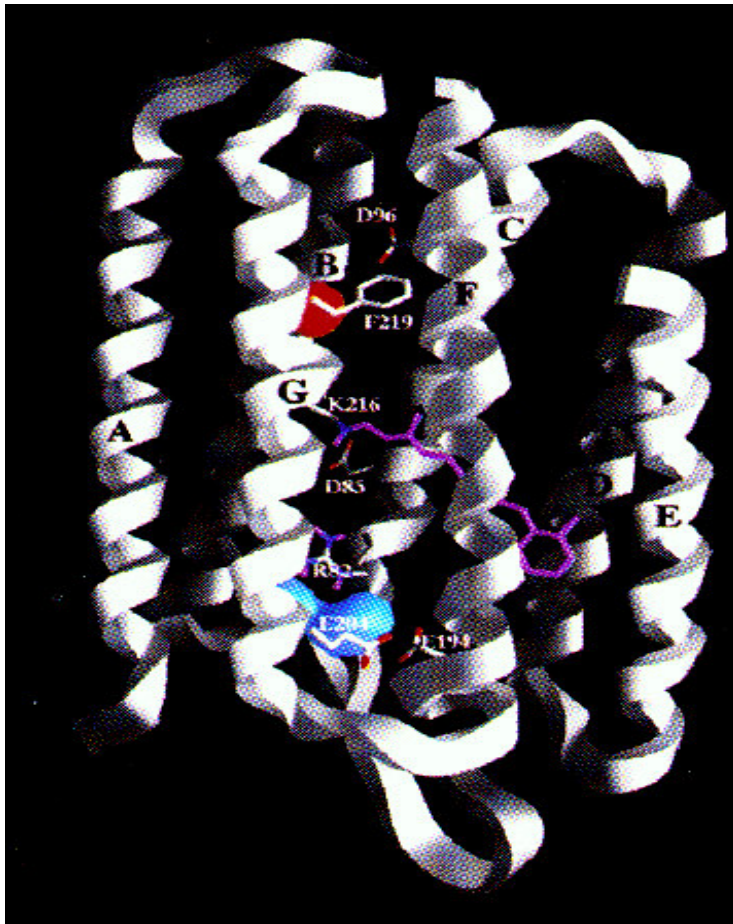
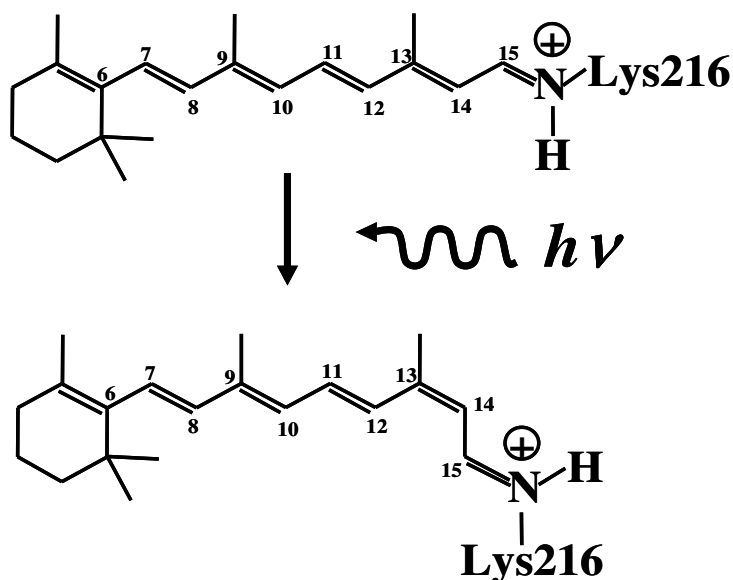


Abbildung 1.1:
bR-Struktur aus Röntgen-Struktur-
analyse (Peptidgerüst weiß,
Retinalchromophor violett). Die
Helices sind mit A bis G beschriftet
[Lue1999]. Oben liegt die
cytoplasmatische, unten die extra-
zelluläre Seite.

das Sensorrhodopsin als Photorezeptor und schließlich Bakteriorhodopsin als lichtgetriebene Protonenpumpe in der Membran der Purpurbakterien. In bR isomerisiert der Retinalchromophor von der all-trans- in die 13-cis-Konfiguration (Abbildung 1.2). Die Photoisomerisierung löst einen Photozyklus aus, der aus einer Serie von thermisch getriebenen Reaktionsschritten besteht.

Die primäre Photoreaktion wird durch die Proteinumgebung optimiert und räumlich eingeschränkt, was beim Vergleich mit der Photoisomerisierung vom protonierten Schiff Base Retinal (PSBR) in Lösung deutlich wird. Beim all-trans-PSBR in Ethanol [Ham1997b] entstehen aus dem Zerfall des elektronisch angeregten Singulettzustands (S_1) mit den Zeitkonstanten 2 und 7,2 ps das 13-cis-Isomer und das 11-cis-Isomer. Im Unterschied dazu läuft im Protein der S_1 -Zerfall wesentlich schneller ab und es entsteht nur ein Isomer. Wie laufen diese von der Natur optimierten Prozesse in der molekularen Ebene des Proteins auf der Femtosekunden-Zeitskala ab? Diese Frage wird in dieser Arbeit in Bezug auf bR aufgegriffen. Das Ziel ist, die primären Reaktionen mittels Femtosekunden(fs)-Infrarot(IR)-Spektroskopie aufzulösen und detailliert zu beschreiben.

Durch die Ergebnisse der sichtbaren fs-Spektroskopie an bR [Dob1988; Mat1988; Gai1998; Ye1999; Har1996] (Kapitel 1.1.1) sind bereits Modelle zur Primärreaktion (Abbildung 1.3

**Abbildung 1.2:**

Durch Belichtung isomerisiert der Retinalchromophor von der all-trans- in die 13-cis-Konfiguration. Die Verdrehung geschieht um die $C_{13}=C_{14}$ -Bindung. Die Schiff'sche Base (NH) ist positiv geladen. Durch die Isomerisierung verändert sich die elektrostatische Wechselwirkung mit der Umgebung. (Mit den Zahlen werden die Kohlenstoffatome nummeriert).

rechts) erarbeitet worden. Es wird mit der sichtbaren (VIS) fs-Spektroskopie die Dynamik des S_1 -Zustands verfolgt und somit die Lebenszeit des elektronisch angeregten Zustands bestimmt (Abbildung 1.3 links). Aus den Ergebnissen ergibt sich ein allgemeines Modell: der elektronisch angeregte Zustand zerfällt und es entsteht parallel der erste elektronische Produktgrundzustand, das Photozyklusintermediat J mit 0,5 ps. Die weiteren Reaktionen folgen dem Photozyklus (Abbildung 1.4). Der J-Zustand geht in den zweiten Zustand K, mit 3 ps [Pol1986] über, der innerhalb von Mikrosekunden zerfällt.

Der J- und der K-Zustand lassen sich im sichtbaren Spektralbereich (elektronische Absorption) durch die rotverschobenen Absorptionsmaxima (J: 620 nm; K: 590 nm) und anhand ihrer Zeitverläufe charakterisieren. Jedoch kann die fs-VIS-Spektroskopie trotz ihrer Möglichkeit mit hoher Zeitauflösung (bis 5 fs [Kob2001]; bis 30 fs [Zin2001]) zu messen, nicht direkt die strukturelle Dynamik verfolgen. Anders die Schwingungsspektroskopie: in den Schwingungsspektren stecken Informationen zu Moleküleigenschaften wie Bindungslängen, Ladungsverschiebung und Isomerisierung. Durch zeitaufgelöste oder statische Fourier-Transform-Infrarot(FTIR)-Spektroskopie [Röd1999a] oder Resonanz-Raman(RR)-Spektroskopie kann im K-Zustand die Chromophorkonfiguration eindeutig als 13-cis-Konfiguration identifiziert werden [Smi1987; Bra1982].

Es gibt allerdings keine Beschreibung der strukturellen Vorgänge in den ersten Pikosekunden durch zeitaufgelöste Schwingungsspektroskopie. Diese Lücke schließt das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Femtosekunden-Infrarot-Spektrometer. Ein Titan-Saphir-Laser liefert die fundamentalen Lichtpulse (775 nm; 170 fs; 0,6 mJ) (Kapitel 2.2.2) bei einer Wiederholfrequenz von 0,7 kHz. Um die hohe Zeitauflösung und einen breiten spektralen Bereich mit Laserpulstechnik zu erreichen, werden nichtlineare optische Methoden (Kapitel 2.1.3) angewandt. Durch optische Verstärkung und Frequenzmischung werden IR-Pulse von 170 fs Länge erzeugt. Gleichzeitig werden Laserpulse mit 100 fs Länge für die Anregung der

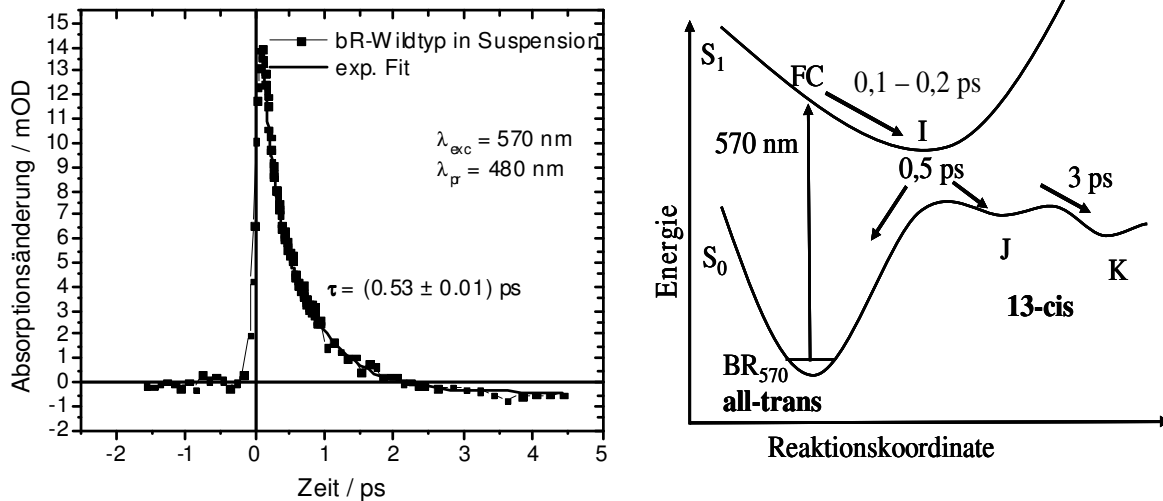


Abbildung 1.3:

Links: Die Absorption des S_1 -Zustands bei 480 nm zerfällt mit 0,53 ps. Für die Suspension bei Zimmertemperatur wurde pH7 mit 1 mM TRIS und 15 mM KCl eingestellt. Anregungswellenlänge: 570 nm. Rechts: Potentialschema zur Primärreaktion [Dob1988; Mat1988]. Für das Modell wird die Annahme gemacht, dass die 13-cis-Entstehung mit 0,5 ps abläuft. (FC: Franck-Condon-Zustand; I,J,K: Zwischenzustände).

Probe im Absorptionsmaximum des elektronischen Grundzustands BR_{570} generiert. Nach dem Prinzip der Anregungs-Abtast-Methode¹ werden am Ort der Probe Abtast- und Anregungspulse räumlich überlagert und zeitlich gegeneinander verzögert. Das Messsignal ist die Transmission der IR-Abtastpulse in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit gegenüber des Anregungspulses und der Wellenzahl. Hohe Ansprüche an das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des fs-Spektrometers (Kapitel 3) werden dadurch gestellt, dass die IR-Differenzsignale (einige mOD), im Vergleich zu der Hintergrundabsorption (etwa 1 OD durch Absorption von Protein und Wasser) sehr klein sind.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig die direkten Markerbanden für die all-trans nach 13-cis-Isomerisierung im C-C-Streckschwingungsbereich (1150 bis 1250 cm^{-1}) (Kapitel 4.3.1) zusammen mit den C=C- und C=NH-Streckschwingungsregionen (1460 bis 1670 cm^{-1}) (Kapitel 4.2 und 4.4) mit einer Zeitauflösung höher als 230 fs anhand von transients VIS-Anregungs/IR-Abtast-Spektroskopie untersucht, vorgestellt und diskutiert. Diese Zeitauflösung ist ausreichend, um die Dynamik im Zeitraum des S_0 - S_1 -Übergangs abzudecken. Mit der spektralen Auflösung von 3 bis 5 cm^{-1} werden die 12 bis 18 cm^{-1} breiten Schwingungsbanden vom Chromophor klar herausgearbeitet.

In den Bereichen der HOOP (Hydrogen-Out-Of-Plane)-Schwingungen und der C-C-, C=C-, und der C=NH-Streckschwingungen sind transiente Daten zwischen -3 und 50 ps aufgenommen worden. Es werden in den entsprechenden Kapiteln die Resultate (Kinetiken und Spektren) gezeigt und anschließend die Ergebnisse aus den Analysemethoden (Kapitel

¹ Auch Pump-Probe-Methode genannt.

4.1.2) präsentiert. Es zeigt sich deutlich, dass die Markerbande für die 13-cis-Konfiguration mit 0,5 ps entsteht und das gesamte spektrale Muster der 13-cis-Struktur schon nach 1 ps erreicht wird (Kapitel 4.7). In den einzelnen Absorptionsbanden überlagern sich Beiträge von verschiedenen dynamischen Prozessen. So ist es zum Teil nicht möglich, z.B. die J-Entstehung und den Rückgang des Bleichsignals spektral klar voneinander zu trennen. Im Protein bR5.12 (Kapitel 4.8) wird die Untersuchung des elektronisch angeregten Zustands dadurch erleichtert, dass seine Lebensdauer lang ist und dass es keine überlappenden Photozyklusprodukte gibt. Da einige Banden aus dem 0 ps-Spektrum des Wildtyps, denen im Schwingungsspektrum des elektronisch angeregten Zustands des bR5.12 ähneln, kann auf die molekulare Dynamik im elektronisch angeregten Zustand vom Wildtyp geschlossen werden.

Es hat sich gezeigt, dass mit dem Spektrometer gute Resultate erzielt werden. Für die Entwicklung eines detaillierten Modells werden in der Diskussion die Ergebnisse in ein Reaktionsschema (Kapitel 5) übertragen. Es wird dasjenige Modell bestätigt und erweitert, bei dem es eine Reaktionsverzweigung aus dem elektronisch angeregten Zustand heraus gibt. Der eine Zweig ist nicht reaktiv und führt in einen heißen Grundzustand mit all-trans-Konfiguration, der reaktive Zweig führt zum Photozyklusprodukt J mit 13-cis-Konfiguration. Die Erfolge der vorliegenden Arbeit weisen den Weg für die Anwendung der Methode auf andere, biophysikalisch relevante Systeme wie z.B. weitere Retinalproteine, Phytochrome oder künstliche molekulare Schalter.

1.1 Grundlagen zur lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin

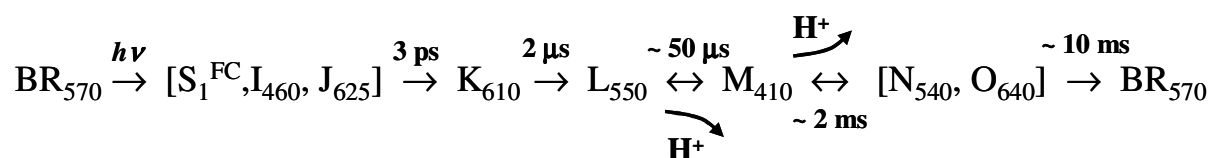


Abbildung 1.4:

Photozyklus des bR-Wildtyps bei neutralem pH-Wert. Die Zykluszeit ist abhängig vom pH-Wert der Suspension. Die eckige Klammer am Beginn des Photozyklus fasst die Zustände der Primärreaktion zusammen. Eine genaue Diskussion der Primärreaktion befindet sich in Kapitel 1.1.1.1. Nach 100 ms sind die bR-Moleküle wieder zurück im Ausgangszustand BR₅₇₀.

Membranproteine sind von grundlegender Bedeutung für das Leben von Zellen. Sie ermöglichen sowohl den selektiven Transport von Molekülen durch die Zellmembran als auch die Wahrnehmung und Übertragung von Informationen ins Zellinnere. In der biophysikalischen Grundlagenforschung wird das Bakteriorhodopsin als Modellprotein für

Ionenpumpen, Retinalproteine oder optische Schalter untersucht. Bakteriorhodopsin arbeitet als photoinduzierte vektorielle Protonenpumpe im *Halobacterium salinarum* und erzeugt ein transmembranes elektrochemisches Potential, um damit die Energieversorgung der Zelle zu betreiben. Halobakterien sind eine sehr ungewöhnliche Lebensform auf der Erde. Nur diese den Archaea zuzurechnenden Organismen können in ausgetrockneten Salztümpeln oder Salinen überleben, in denen Kochsalz bis zur Sättigungsgrenze gelöst ist. Für das Überleben unter diesen Bedingungen haben Halobakterien alle ihre zellulären Bestandteile, wie Proteine oder Zellmembranen, so weit angepasst, dass diese ihre Funktion unter Hochsalzbedingungen und Sauerstoffarmut erfüllen können.

Bakteriorhodopsin ist ein integrales Membranprotein (27 kDa), das aus sieben transmembranen, helikalen Segmenten (A-G) besteht. An der G-Helix am Lysin 216 (K216) ist über eine protonierte Schiff'sche Base (SB) kovalent der Retinalchromophor gebunden (Abbildung 1.1; Abbildung 1.2). Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse und der magnetischen Kern-Resonanz(NMR)-Spektroskopie wird die Struktur von Proteinen atomar aufgelöst. Aus ihnen gewinnt man die Abstände, Ausrichtungen und Positionen der Proteinkomponenten und der proteingebundenen Wassermoleküle, und bekommt so eine Vorstellung über die herrschenden elektrostatischen Felder und über die Van der Waals-Kräfte. Aus der Röntgenstruktur mit 1,5 Å-Auflösung ist ein genaues Bild entstanden über die Anordnung der Aminosäuren, des Chromophors und den Wassermolekülen im Grundzustand [Lue1999]. Molekülgruppen, die aus konjugierten Bindungen der Art $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$ bestehen, heißen Polyene und besitzen meist ein delokalisiertes Elektronensystem. Ist die Polyenkette des Retinals linear, spricht man von der all-trans-Konfiguration. Das Retinal in Lösung absorbiert bei 380 nm. Die Bindung an das Protein führt zu der Rotverschiebung (Opsin shift) des Absorptionsmaximums zu 570 nm und gibt dem Protein somit seine charakteristische purpurne Farbe. Die Absorption eines Photons durch den Chromophor im Grundzustand BR₅₇₀ führt zu dessen Isomerisierung. Diesem Prozess folgt eine serielle Sequenz von Reaktionen (Photozyklus), die das Protein über die Zwischenzustände J, K, L, M, N, O zurück in den Grundzustand BR₅₇₀ führt (Abbildung 1.4). Für diesen Zyklus braucht das Protein je nach pH-Wert seiner wässrigen Umgebung 20 bis 500 ms. In dem Schritt L→M wird ein Proton an der extrazellulären Seite abgegeben, gleichzeitig wird die protonierte Schiff'sche Base deprotoniert. Im Schritt M→N nimmt das Protein an der cytoplasmatischen Seite ein Proton auf, gleichzeitig wird die umorientierte Schiff'sche Base wieder protoniert, so dass nach Beendigung eines Zyklus ein Proton durch die Membran gepumpt wurde. Die Quantenausbeute für den Prozess ist zu ~ 64 % [Log1997; Sch1989; Tit1990] bestimmt worden. Das bedeutet, dass 36 % der Moleküle, die ein Photon absorbiert haben, ohne ein Proton zu pumpen, in den Ausgangszustand BR₅₇₀ zurückkehren. Die Verzweigung in einen reaktiven und einen nicht reaktiven Zweig findet noch vor der K-Entstehung statt. Im reaktiven Zweig spiegelt sich die Energierelaxierung des Proteins in den

unterschiedlichen Lagen der Absorptionsmaxima der Zwischenzustände (auch Intermediate genannt) im sichtbaren Spektralbereich wider. Zur klaren Bezeichnung wird das jeweilige Absorptionsmaximum als Index an das Intermediatskürzel angehängt (Abbildung 1.4).

In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf dem Beginn des Photozyklus (Primärreaktion), der den Zeitbereich zwischen Franck-Condon- und K-Zustand umfasst.

1.1.1 Stand der Forschung: Der zeitliche Ablauf der Primärreaktion

Die Primärreaktion, wie sie in der Einleitung beschrieben worden ist, ist durch VIS-Spektroskopie und durch Schwingungsspektroskopie charakterisiert worden. In diesem Kapitel wird über den Stand der Forschung in der Literatur berichtet. Im Sichtbaren wurde die Dynamik der gesamten Primärreaktion genau bestimmt, wobei nur Annahmen über die strukturellen Abläufe gemacht werden können. Als erstes Photozyklusprodukt ist das K-Intermediat durch Schwingungsspektroskopie strukturell klar charakterisiert.

1.1.1.1 Reaktionsmodelle aus der sichtbaren Femtosekunden-Spektroskopie

In diesem Kapitel werden die experimentellen Resultate der sichtbaren fs-Spektroskopie und die daraus entstandenen Modelle erläutert.

In der Tabelle 1.1 sind die Ergebnisse zur Entstehung und zum Zerfall des elektronisch

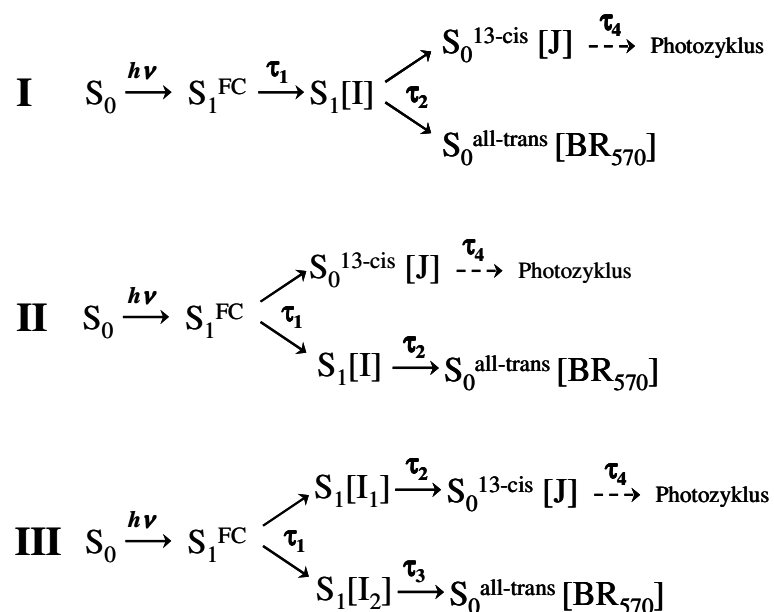


Abbildung 1.5:

Drei Reaktionsschemata auf der Basis von fs-VIS-Spektroskopie.

Es gibt verschiedene Zeitpunkte für die Reaktionsverzweigung. Der nichtreaktive behält den all-trans Chromophor, der reaktive die 13-cis-Konfiguration. Die Quellen hierfür sind in Tabelle 1.1 aufgelistet. (FC: Franck-Condon; I: Zwischenzustand auf S_1)

angeregten Zustands und der stimulierten Emission im Spektralbereich von 400 bis 1000 nm aufgelistet. Auf Grundlage dieser Experimente sind unterschiedliche Reaktionsmodelle zur Primärreaktion entwickelt worden. Als Primärreaktion wird der Vorgang von der Photonenabsorption bis zum Erreichen des K-Zustands angesehen. Ab Erreichen des Franck-Condon-Zustands, S_1^{FC} , ist die Meinung in der Literatur über den weiteren Verlauf der Primärreaktionen geteilt. Je nach Quelle variieren die bestimmten Zeitkonstanten und es werden die Abläufe unterschiedlich interpretiert. Es kristallisieren sich nach der Analyse der Referenzen drei prinzipiell unterschiedliche Reaktionsabläufe heraus, die in Abbildung 1.5 dargestellt sind:

Im ersten Modell führt nach der Anregung des lichtadaptierten Grundzustands BR_{570} eine schnelle Relaxierung aus dem Franck-Condon-Bereich in ein Minimum der S_1 -Potentialfläche. Dieser Zustand, I_{460} , hat sein Absorptionsmaximum bei 460 nm. Es folgt dann die Isomerisierung entlang einer Torsionskoordinate. I_{460} zerfällt ($\tau_2 = 0,5$ ps) gemäss der Quantenausbeute, aufgeteilt über einen reaktiven Zweig in das erste Photozyklusprodukt J_{625} und über einen nichtreaktiven Zweig zurück in den Ausgangszustand BR_{570} .

Im zweiten Schema geschieht in der FC-Region eine Aufteilung der Reaktionswege. Der reaktive Zweig führt mit τ_1 direkt zum ersten isomerisierten Photozyklusprodukt, der nichtreaktive von einem S_1 -Zustand mit τ_2 in den all-trans-Grundzustand BR_{570} .

Das dritte Modell ist eine Erweiterung des zweiten Schemas. Es unterscheidet sich dadurch, dass es für beide Zweige einen S_1 -Zustand gibt. Der nichtreaktive Zweig führt mit τ_3 in den all-trans-Grundzustand, im reaktiven Zweig geht das Molekül in das isomerisierte Photozyklusprodukt J_{625} über.

All diese experimentellen Daten sind mit hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und guter Zeitauflösung aufgenommen worden, aber die Ergebnisse lassen sich nicht zu einem eindeutigen Modell zusammenfassen. Ye et al. [Ye1999] haben einen alternativen Ansatz gewählt, um Aufschlüsse über Abläufe auf der S_1 -Oberfläche zu bekommen: dazu wird ein

Referenz	Modell	τ_1 /ps	τ_2 /ps	τ_3 /ps	τ_4 /ps
[Mat1988] [Dob1988] [Har1996]	I	0,1-0,2	0,5		3
[Has1996] [Gai1997]	III	0,03	0,24	0,75	3
[Kan1993]	III	0,1-0,2	0,5	1-2	3
[Ye1999]	III	0,08	0,53		3
[Kob1998]	II	0,2	0,5		3

Tabelle 1.1:

Referenzen und Zerfallzeiten der Modelle, die in Abbildung 1.5 dargestellt sind (τ_i : Zerfallszeit).

Protein (bR5.12), das einen sterisch veränderten Retinalchromophor enthält, untersucht. Der Chromophor kann seine Konfiguration nicht ändern und somit keine Protonen pumpen. Das bR5.12 absorbiert wie der Wildtyp bei 570 nm und wird durch die Photonen in den elektronisch angeregten Zustand gehoben. Dessen S_1 -Lebenszeit beträgt 17 ps. Aber beim Vergleich der spektralen Entwicklung von bR5.12 und bR-Wildtyp in den ersten 100 bis 200 fs sind keine Unterschiede festzustellen. Während dieser Periode erscheinen sowohl die stimulierte nahinfrarote Emission (700 bis 1000 nm) als auch die intensive 460 nm-Absorption, die beide zum fluoreszierenden I-Zustand gehören, innerhalb von 30 fs. Die Übereinstimmung der Dynamik zwischen dem artifiziellen und dem nativen Protein bedeutet, dass eine substantielle $C_{13}=C_{14}$ -Torsion nicht in dieses Zeitfenster fallen kann. Somit kann Modell II ausgeschlossen werden. Dies ist ein Beispiel dafür, dass Aussagen zu molekularen Strukturveränderungen im Protein nur indirekt und nicht aus dem nativen Protein selber gewonnen werden.

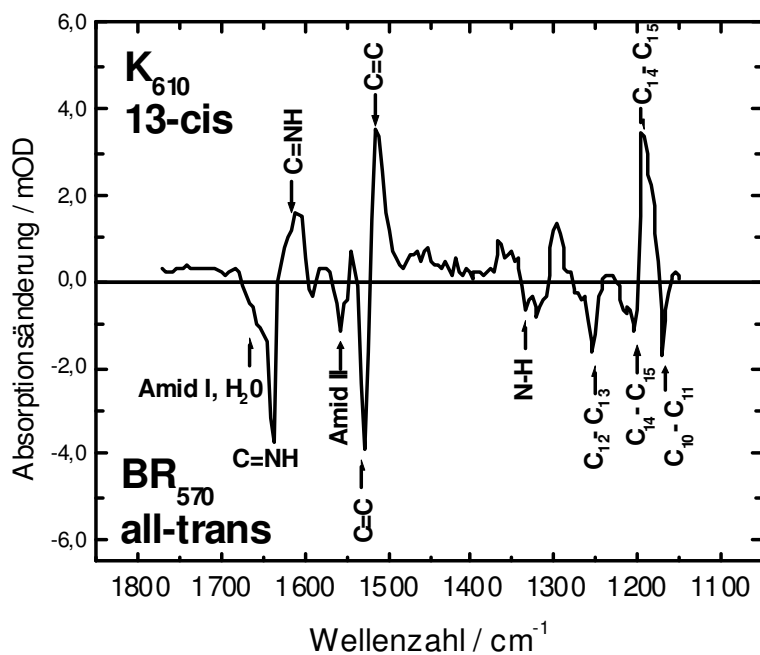


Abbildung 1.6:

IR-Absorptionsdifferenzspektrum des K-Intermediats (nach 12 ps) von Bakteriorhodopsin mit Bandenzuordnungen. Die positiven Banden gehören zu dem Photozyklusprodukt, K_{610} , die negativen zum Grundzustand BR_{570} . Amid I bezeichnet die C=O-, Amid II die C-NH-Streckschwingung.

1.1.1.2 Ergebnisse aus der Schwingungsspektroskopie

Die IR- und Raman-Differenzschwingungsspektren (Abbildung 1.6) von Proteinen sind sehr linienreich und liefern viele Details über das untersuchte Molekül. Doch ist die Zuordnung der vielen Absorptionsbanden zu den entsprechenden Schwingungsmoden äußerst schwierig und weiterhin eine große Herausforderung. Es wird versucht durch Experimente mit modifizierten Proteinen, bei denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht werden, oder mit Isotopenmarkierungen diese Zuordnungen zu vervollständigen. Im Fall von bR dominieren in den Raman- oder Resonanz-Raman-Spektren die Chromophorbanden durch ihre große

Amplitude, weshalb zwischen Protein und Chromophorbanden deutlich unterschieden werden kann. Im IR-Spektrum kann somit ein Teil der Banden als Chromophorbanden identifiziert werden².

	PSBR in Ethanol [Smi1987] $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}	BR ₅₇₀ [Smi1987] $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}	K ₆₁₀ [Bra1982] $\tilde{\nu}$ / cm^{-1}
HOOP			957
C ₁₀ -C ₁₁	1159	1169	
C ₁₄ -C ₁₅	1191	1201	1195
C ₈ -C ₉	1204	1214	
C ₁₂ -C ₁₃ + Lysin	1237	1250	
NH von C=NH, 15H		1348	
C ₇ =C ₈ , C ₅ =C ₆		1606, 1527	
C ₉ =C ₁₀ , C ₁₁ =C ₁₂	1562	1527	1519
C ₁₃ =C ₁₄		1581, 1527	
C=NH	1662	1640	1609/1623

Tabelle 1.2:

Bandenzuordnung im IR-Spektrum der all-trans-PSBR-Normalschwingungen (PSBR protoniertes Schiff Base Retinal), BR₅₇₀ und K₆₁₀. Die Rotverschiebung des S₀-Absorptionsmaximums lässt sich deutlich an der Lage der C=C-Streckschwingungen ablesen. Im K-Zustand gibt es nur wenige Zuordnungen.

Am PSBR in Lösung und an Bakteriorhodopsin sind RR-Untersuchungen mit Isotopenmarkierungen am Chromophor durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden mit Normalmodenkalkulationen³ verglichen und somit eine Zuordnung der Chromophorbanden im RR-Spektrum zu Schwingungsmoden des Moleküls geschaffen [Smi1987; Cur1985].

In Braiman et al. [Bra1982] wurde mit RR-Tieftemperaturmessungen⁴ die charakteristischen Merkmale des 13-cis-Schwingungsspektrums des K-Intermediats bestimmt. Es wurden der 13-cis-Konfiguration drei Banden zugeordnet: 957 cm^{-1} , 1195 cm^{-1} und 1519 cm^{-1} . Alle drei

² Bei Molekülen, deren Symmetrie gebrochen ist, sind auch die Auswahlregeln zum Teil aufgehoben, so dass es möglich ist, die gleichen Schwingungsmoden im IR- wie im Raman-Spektrum zu beobachten. Normalerweise sind durch die Auswahlregeln bei kleinen symmetrischen Molekülen die IR- und RR-Methode komplementär.

³ Bei der Normalmodenanalyse wird versucht, die Dipolmomente zu bestimmen, um damit die Eigenmoden des Moleküls zu berechnen. Mit Hilfe der Bewegungsmoden aus der Normalmodenanalyse eines Proteins lassen sich spezifische Bewegungsmoden genau charakterisieren. Die Normalmoden können auch verwendet werden, um Infrarot- und Raman-Spektren ganzer Proteine zu berechnen. Durch Vergleich mit experimentellen Spektren können damit dreidimensionale Strukturmodelle von Proteinen überprüft werden.

⁴ Bei Tieftemperaturmessungen des K-Zustands wird lichtadaptiertes bR auf 77 K abgekühlt und anschließend durch Belichtung der Photozyklus gestartet. Die Energie reicht aber aufgrund der tiefen Temperatur nicht aus, um die Potentialbarriere zwischen K- und L-Zustand zu überwinden. Das Molekül verbleibt im K-Zustand und ist so zugänglich für statische Spektroskopiemethoden.

Banden haben ähnliche Intensitäten im RR-Spektrum. Mit der FTIR-Methode sind die gleichen Bandenlagen und ähnliche Intensitäten festgestellt worden [Rot1984]. Eine vierte 13-cis-Bande mit geringer Intensität bei $1609/1623\text{ cm}^{-1}$ ist nur im FTIR-Spektrum und nicht im RR-Spektrum deutlich zu erkennen.

Die 957 cm^{-1} -Bande gehört zum Spektralbereich der HOOP-Banden. Die HOOP-Moden setzen sich aus Schwingungen der H-Atome senkrecht zur Polyketten-Ebene zusammen. Der BR_{570} -Zustand hat nur kleine HOOP-Schwingungsbanden, da bei planaren Molekülen die Intensitäten der HOOP-Banden gering sind.

Die C-C-Bindungen des Retinalchromophors führen symmetrische Streckschwingungen aus, die im Spektralbereich zwischen 1150 und 1250 cm^{-1} absorbieren. Strukturveränderungen der Polykette wirken sich empfindlich auf ihre Frequenzen aus und sind damit ein Indikator für den Isomerisierungszustand des Chromophors. Für dieses charakteristische spektrale Muster wird die Bezeichnung "Fingerprint-Bereich" gebraucht. Bei 1195 cm^{-1} wird im RR-K-Spektrum eine deutliche Bande gefunden. Diese wird der $\text{C}_{14}\text{-C}_{15}$ -Streckschwingung der 13-cis-Konfiguration zugeordnet. Für die weiteren all-trans-C-C-Banden in Tabelle 1.2 gibt es keine Zuordnungen im 13-cis-Spektrum.

In der Polykette gibt es fünf Ethylen($\text{C}=\text{C}$)-Bindungen (Abbildung 1.2), deren Streckschwingungen im Spektralbereich von 1510 bis 1600 cm^{-1} absorbieren. Die in Phase schwingenden $\text{C}=\text{C}$ -Bindungen ergeben die Normalschwingungsmode, die bei 1529 cm^{-1} absorbiert. Die Verteilung der π -Elektronen in der Polykette bestimmt sowohl den Doppelbindungscharakter als auch das elektronische Absorptionsmaximum. Deshalb korrespondiert zum S_0 -Absorptionsmaximum eines jeden Photozyklusintermediates auch eine entsprechend verschobene $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung. Es ergibt sich eine lineare Korrelation [Rim1973; Ber1990] zwischen Absorptionsmaximum und Wellenzahl der $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung. Demnach ist einem rotverschobenen Photozyklusprodukt auch eine rotverschobene $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung zuzuordnen. Im infraroten Spektralbereich gehört zum rotverschobenen J_{625} -Intermediat die 1510 cm^{-1} - $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingungen und zum K-Intermediat die 1519 cm^{-1} - $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung [Ber1990; Doi1991].

Der Stickstoff der Schiffchen Base ist über eine Doppelbindung mit dem C_{15} vom Retinalchromophor verbunden. Die $\text{C}_{15}=\text{NH}$ -Streckschwingung ist die energiereichste Chromophorbande, sie absorbiert im BR_{570} -Spektrum bei 1640 cm^{-1} . Durch die Isomerisierung werden sich die Bindungseigenschaften und die elektrostatische Umgebung der protonierten SB ändern, was sich in einer Rotverschiebung der Schwingungsbande im IR-Absorptionsspektrum widerspiegelt. Es kommen im K-Spektrum [Rot1984] zwei Banden dafür in Frage: bei 1623 und 1609 cm^{-1} . Interessanterweise verschiebt die 1623 cm^{-1} -Bande nicht, wenn das C_{15} deuteriert wird, somit kann angenommen werden, dass die $\text{C}=\text{NH}$ -

Streckschwingung bei 1609 cm^{-1} absorbiert⁵.

Die Schwingungsbanden, die höher als der Wellenzahlbereich der C=NH-Streckschwingung liegen, sind nicht mehr dem Chromophor zuzuordnen. Bei 1661 cm^{-1} wird bei Diller et al. [Dil1995] eine deutliche negative Absorptionsbande gemessen, die keinen Rückgang wie bei der 1640 cm^{-1} -Bleichbande zeigt. In diesem Spektralbereich kann die Amid I-Schwingung⁶ (1660 cm^{-1}) oder die Biegeschwingung eines Wassermoleküls in der Nähe der SB für diese Absorption verantwortlich sein.

Die transiente Raman-Spektroskopie [Doi1991; Ber1990; Bra1991] ergab, dass die 13-cis-Banden und damit auch das K-Intermediat mit ca. 3 ps entstehen. Mit der anti-Stokes-Raman-Spektroskopie⁷ hat man festgestellt, dass der K-Entstehung über den gesamten Spektralbereich ein Zerfall mit einer Zeitkonstante von 2,5 ps überlagert ist. Dies wird mit einem Abkühlungsprozess heißer Schwingungsbanden erklärt. Und somit wird das J-Intermediat als unrelaxierter Vorläufer zum K-Zustand angesehen. In den Raman-Messungen wird als J-Indiz zum Zeitnullpunkt eine breite unstrukturierte HOOP-Bande aufgeführt, die den verdrillten Zustand nach dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustands aufzeigt. Die J-Entstehung konnte im C=NH- und im C=C-Streckschwingungsbereich durch zeitaufgelöste sub-Pikosekunden-IR-Spektroskopie [Dil1995; Dil1998] verfolgt werden. In den transienten IR-Absorptionsmessungen [Dzi1996; Dil1998] des C=C-Streckschwingungsbereichs konnte das Entstehen der 1510 cm^{-1} -Bande innerhalb von 1 ps nachgewiesen werden. Die IR-Absorptionsmessungen mit einer Zeitauflösung von $\sim 400\text{ fs}$ (FWHM) von Diller et al. [Dil1995] zeigen, dass bei 1607 cm^{-1} eine positive Absorptionsbande innerhalb von 1 ps entsteht. In diesen Messungen sind Zeitkonstanten zwischen 1,4 und 2,4 ps für den Rückgang des Bleichsignals bestimmt worden. Der vergleichsweise langsame Rückgang des Bleichsignals wird auf das Abkühlen von heißen Schwingungsbanden zurückgeführt. Eine deutlich konträre Sichtweise zum Zeitpunkt der Isomerisierung wurde in Atkinson et al. [Atk2000] veröffentlicht. Die CARS(coherent anti-Stokes-Raman scattering)-Messungen wurden so interpretiert, dass eine Isomerisierung im J-K-Übergang stattfindet und das J-Intermediat im elektronisch angeregten Zustand liegt.

Mit dem Protein bR5.12, das einen Retinalchromophor enthält, der durch einen eingebauten fünf-Ring an einer Isomerisierung gehindert wird, sind Messungen im sichtbaren Spektralbereich [Ye1999] und mit Schwingungsspektroskopie [Ujj2000] durchgeführt worden, um das Verhalten auf der S_1 -Oberfläche zu beobachten. Mit dem bR5.12 hat man die Möglichkeit eine langlebigere S_1 -Dynamik als im bR-Wildtyp zu untersuchen, die der

⁵ Die Untersuchung der Isomerisierung von PSBR in Ethanol bringt keine Erkenntnisse, da die $C_{15}=NH$ -Streckschwingung aufgrund der unveränderten elektrostatischen Umgebung nicht verschiebt.

⁶ C=O-Streckschwingung des Peptidgerüsts.

⁷ anti-stokes-Raman-Banden sind aktiv, wenn es angeregte Schwingungszustände gibt.

von bR-Wildtyp sehr ähneln kann, da das π -Elektronensystem durch den fünf-Ring aber nicht stark gestört wird. Zudem stören keine überlappenden Photoprodukte die S_1 -Banden.

1.2 Motivation und Zielsetzung

Die Modelle zur Primärreaktion, die auf der Grundlage der Experimente im sichtbaren Spektralbereich entwickelt worden sind, lassen sich anhand von Schwingungsspektren, mit denen sich Isomerisierungszustand, Ladungsverschiebung oder Kernbewegungen direkt nachweisen lassen, überprüfen. Da aber IR-Schwingungsspektren mit einer hinreichenden spektralen und zeitlichen Auflösung im Fingerprint-Bereich bisher nicht erstellt werden konnten, fehlt eine sichere Aussage über die strukturelle Dynamik der Chromophorisomerisierung. Die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit liegt darin, diesen Prozess mittels eines neu aufgebauten fs-IR-Spektrometers aufzulösen.

Wie schon in dem Kapitel 1.1.1 zum Stand der Forschung deutlich gemacht wurde, herrscht eine kontroverse Diskussion in der Literatur darüber, welchem Prozess während der Primärreaktion die Isomerisierung zugeordnet werden kann. Bei Atkinson et al. [Atk2000] wird aufgrund von schwingungsspektroskopischen Daten argumentiert, dass der J-K-Übergang als Isomerisierungszeitpunkt in Frage kommt. Da die Zeitauflösung der CARS-Methode ($\Delta t > 3$ ps) nicht ausreicht, um auch einen früheren Zeitpunkt auszuschließen, wird nur indirekt argumentiert. Demnach gehört der J-Zustand zum elektronisch angeregten Zustand. Es bleibt aber unverständlich, wie dies zu den Ergebnissen aus dem sichtbaren Spektralbereich passen soll (Kapitel 1.1.1.1). Bei dem einfachen Potentialmodell aus Abbildung 1.3 bleiben viele Fragen zu den Übergängen noch offen: Kann es eine Isomerisierung noch während des elektronisch angeregten Zustands geben? Wie läuft der Rückgang der Moleküle nach BR₅₇₀ ab, die nicht isomerisieren? Wie lässt sich der J-Zustand charakterisieren? Wie reagiert die Proteinumgebung auf die elektronische Anregung? In der vorliegenden Arbeit werden nun mit Transienten und Spektren zwischen 940 und 2000 cm^{-1} und einer Zeitauflösung von ~ 200 fs werden charakteristische Merkmale herausgearbeitet und die Prozesse aufgelöst und somit Antworten auf obige Fragen gefunden.

Ein Teil der Ergebnisse zur Isomerisierung ist bei Herbst et al. [Her2002] veröffentlicht.

