

1 Einleitung

Das Makromolekül Bakteriorhodopsin steht seit Jahren im Brennpunkt interdisziplinärer Forschung. Eine Trinität an Sichtweisen (Biophysik, Physik der Makromoleküle, angewandte Biophysik) und damit verbundener Interessen läßt sich erkennen.

I) Betrachtet man das Molekül aus biophysikalischer und chemischer Sicht, dann erweist es sich als ein Transmembranprotein, das Hauptbestandteil einer Photosynthese ist. In einer erweiterten Definition versteht man unter der Photosynthese einen "Prozeß, der einer Zelle Wachstum mit Licht als einziger Energiequelle erlaubt".¹ Sie läßt sich grob in zwei Klassen unterteilen. Kennzeichen der ersten Klasse² ist eine lichtabhängige Reaktion (Lichtreaktion), die Energie in Form von Licht verbraucht und NADPH und ATP synthetisiert, die in einer lichtunabhängigen Reaktion (Dunkelreaktion) benötigt werden, um Kohlehydrate als stabile chemische Energieträger aufzubauen. Für die Gesamtreaktion, mit deren Hilfe Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt wird, gilt also:



Vertreter dieser Klasse sind beispielsweise grüne Pflanzen und Cyanobakterien, für die A in der Gleichung durch Sauerstoff (O) zu ersetzen ist oder grüne Schwefelbakterien (A = S, Schwefel). Kennzeichen der zweiten Klasse, die durch die Halobakterien gebildet werden, ist der lichtabhängige Aufbau eines Protonengradienten durch die Protonenpumpe Bakteriorhodopsin, der von dem Enzym ATPase genutzt wird, um ATP zu synthetisieren.³ Die Gesamtreaktion lautet:



Dieser Prozeß der Photosynthese ist im Vergleich zum erstbeschriebenen bedeutend einfacher. Zudem gehört der Hauptbestandteil Bakteriorhodopsin mit 26 kDa⁴ zur Gruppe der kleineren Proteine und es existiert ein Strukturmodell⁵ mit atomarer Auflösung, das den statischen Aufbau beschreibt. Diese Vorteile begünstigen die Forschung und führen Jahr für Jahr zu einer Fülle an neuen Erkenntnissen, die insbesondere einen immer tieferen Einblick in die mechanistischen Details der mit Bakteriorhodopsin verbundenen Photosynthese erlauben. Dieses Wissen wird die Photosyntheseforschung insgesamt weiterhin stimulieren und auch das Gebiet des Proteindesigns bereichern.

II) Aus der Sicht der Molekülphysik ist Bakteriorhodopsin ein Makromolekül, das zur Gruppe der Retinal tragenden Proteine (Retinalproteine) gehört. Das Studium von Energieflüssen nach optischer Anregung steht nun im Vordergrund. Da diese Prozesse auf der Subpikosekunden-Zeitskala stattfinden, ist die Subpikosekunden- oder Femtosekundspektroskopie die Methode der Wahl. Die Größe des Moleküls und die damit einhergehende Komplexität stellt eine zusätzliche Herausforderung für den Forscher dar. Ab initio Theorien sind noch nicht machbar oder extrem

¹ Osterhelt D., Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **100** (1996), 1943

² Voet D. et al., *Biochemie*, VCH 1994, 586 ff

³ Oesterhelt D., *Biochem. Intern.* 18 (1989), 673

⁴ 1 Da(1ton) = 1 u = 1.6605655 10⁻²⁷ kg

⁵ Henderson R. et al, *J. Mol. Biol.* **213** (1990), 899; Moffat A.S., *Science* **277** (1997), 1607; Pebay-Peyroula E. et al, *Science* **277** (1997), 1676

schwierig. Phänomenologische Modelle, basierend auf einer Vielzahl und großen Vielfalt an experimentellen Ergebnissen, müssen nun als Ersatz dienen.

III) Die große Stabilität und die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Purpurchromophore, welche als zentrales Element Bakteriorhodopsin enthält, führen zur technologischen Betrachtungsweise als drittes Interessengebiet. Eine große Zahl von Anwendungen wurde schon im Labor realisiert.⁶ Im Hinblick auf eine Markteinführung bildet schon bestehende und etablierte Technik die Konkurrenz. Technologische und wirtschaftliche Kriterien lassen die mit Bakteriorhodopsin verbundenen Innovationen auf dem Gebiet der Informationstechnologie und Bioelektronik am zukunftsreichsten erscheinen. Es geht hier um den Bau von Volumenspeichern⁷ für Computer, die mit Licht beschrieben und ausgelesen werden können. Eine Steigerung der Speicherkapazität um den Faktor 300 im Vergleich zu der bestehenden und auf zwei Dimensionen beschränkten Halbleitertechnologie wird als realistisch angesehen. Paralleles Schreiben und Lesen verspricht zudem einen Zuwachs an Übertragungsgeschwindigkeit.

Bakteriorhodopsin ist eine vektorielle Protonenpumpe, d.h. nach Lichtanregung erfolgt ein gerichteter Protonentransport. Spektroskopisch lassen sich mehrere Zwischenzustände (Intermediate) *J*, *K*, *L*, *M*, *N* und *O* definieren, die in einem Fotozyklus zusammengefaßt werden. Diese Arbeit versucht, durch Studium von Energiedissipation während der ersten Intermediate der molekülphysikalischen Sichtweise gerecht zu werden. Mit diesen Dissipationsprozessen ist eine zeitliche Entwicklung von Schwingungsanregungen verbunden. Typische Zeiten liegen im Bereich von Pikosekunden. Beide Tatsachen führen auf natürliche Weise zur Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie als geeignete Methode. In diesem Spektralbereich sind sowohl Absorptionsbanden des Cofaktors⁸ (= Chromophor = Retinal) als auch des Proteins zu finden, die mit der Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie untersucht werden können, um Energierelaxationsprozesse zu studieren. Die vorliegende Arbeit untersucht den Spektralbereich der Ethylenbande (1498 cm^{-1} - 1542 cm^{-1}), d.h. der symmetrischen Streckerschwingung der C=C - Doppelbindungen des Chromophors. Diese Bande kann einerseits als eine Sonde für den Isomerisierungsprozeß, der nach Lichtanregung während der ersten Intermediate erfolgt, angesehen werden. Andererseits gab die direkte Verknüpfung mit der zeitaufgelösten optischen Spektroskopie zur Hoffnung Anlaß, eine Aussage über das in der Literatur strittige erste Intermediat *J* machen zu können, um so auch die biophysikalische Sichtweise zu berücksichtigen. Nachdem Subpikosekunden-Infrarotspektrometer nicht kommerziell verfügbar waren, sollte in einem ersten Schritt ein CO-Laser aufgebaut werden, der in einem zweiten Schritt in ein bestehendes Femtosekundenlasersystem integriert werden mußte, um so das gewünschte Spektrometer zu bilden.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich wie folgt: Nach der Einleitung wird im 2. Kapitel das notwendige Grundlagenwissen zum Verständnis dieser Arbeit gelegt. Es beinhaltet eine kompakte Einführung (2.1) hinsichtlich Struktur, Funktion und wichtiger optischer- und Infraroteigenschaften der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin. Anschließend stehen die Anregungsprozesse und der Lasermechanismus des CO-Lasers (2.2) im Blickpunkt. Wichtige Begriffe sind hier der Treanor-Anregungsprozeß und die partielle Inversion. Ersterer kann auch die Antwort auf die experimentelle Fragestellung sein, wie man hoch schwingungsangeregte Moleküle erzeugen kann. Im Zentrum des zweiten Kapitels steht die Einführung in die Femtosekunden-Infrarotspektroskopie (2.3). Diese beinhaltet eine Zusammenfassung der mehrjährigen Erfahrung und der Fragestellungen, die beim Arbeiten auf diesem technologisch anspruchsvollen Gebiet zu erwarten sind. Ein einfaches,

⁶ Oesterhelt D. et al, Quart. Rev. Biophys. **24** (1991), 425

⁷ Birge R.R, Spektrum der Wissenschaften **11** (1995), 30

⁸ Cofaktor + Apoprotein = funktionsfähiges Protein

phänomenologisches Modell zur Simulation der zeitlichen Absorptionsänderung der Ethylenbande und eine Simulationsfunktion für Infrarotabsorptionsänderungen von Silicium nach optischer Anregung, die zur apparativen Nullpunktsbestimmung benötigt werden, sind ebenfalls in diesem Unterkapitel zu finden. Den Abschluß dieses Kapitels (2.4) bilden kurze Beschreibungen weiterer Methoden der zeitaufgelösten Schwingungsspektroskopie, die in der Literatur der vorliegenden Arbeit häufig zitiert werden.

Das experimentelle Kapitel (3) beschreibt hauptsächlich den komplexen Aufbau des Subpikosekunden-Infrarotspektrometers. Derzeit lassen sich Absorptionsänderungen⁹ von 1 mOD mit einer Zeitauflösung von 0.6 ps verfolgen. Der Aufbau besteht aus dem CO-Laser (3.1), der die nötigen Wellenlängen zum Abtasten der Banden liefert und in ein Femtosekundenlasersystem integriert ist (3.2). Das folgende Unterkapitel (3.3) erklärt die Datenerfassung, die auf der Lock-in-Methode beruht, und beschreibt die notwendige Datenverarbeitung, um aus den experimentellen Rohdaten die im vierten Kapitel präsentierten Ergebnisse zu gewinnen. Beide letztgenannten Unterkapitel klären auch die paradox wirkende Frage, wie man mit einem Dauerstrich-Abfragelaser Subpikosekunden-Spektroskopie durchführen kann. Das vorletzte Unterkapitel (3.4) ist einer neuen Infrarot (IR)-Justierhilfe gewidmet. Sie wurde zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel, als es um die Justierung des IR-Strahles oder den Überlapp zwischen Infrarotstrahl und Ti:Sa-Laserpulsen ging. Abgerundet wird das 3. Kapitel durch eine Beschreibung (3.5) von reproduzierbar herstellbaren, homogenen und feuchten Bakteriorhodopsinfilmen.

Die experimentellen Ergebnisse (4.1), das verwendete Modell und seine Parameter (4.2) werden im 4. Kapitel vorgestellt. Es schließt sich eine Diskussion (4.3) über die gefundene zeitliche Grob- und zeitliche Feinstruktur der Kinetiken an. Darin wird auch versucht kritisch zu hinterfragen, welche Indizien in der Literatur für einen Vorläufer des *K*-Intermediates existieren und geprüft, welchen Beitrag die vorliegende Arbeit zu diesem Thema liefert. Des Weiteren werden die Ergebnisse in einen größeren Rahmen gestellt, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Retinal in Proteinumgebung und in Lösung zu diskutieren.

Die Arbeit endet mit einer Zusammenfassung mit Ausblick (5), dem Anhang (6) und einem Literaturverzeichnis (7).

⁹ Die Absorptionsänderung bezieht sich in dieser Arbeit immer auf die dekadische Form $I = I_0 \cdot 10^{-OD}$ des Lambert-Beerschen Gesetzes. Für die Einheit der darin vorkommenden optischen Dichte gilt $[OD] = 1$. Trotzdem ist es üblich, kleine Absorptionsänderung von z.B. 10^{-3} in "mOD" anzugeben.

