

**Zeitaufgelöste Photospannungsmessungen und
Absorptionsspektroskopie an den Retinalproteinen
Bacteriorhodopsin und Rhodopsin**

Untersuchungen mit Doppelblitzanregung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
eingereicht im
Fachbereich Physik
der
Freien Universität Berlin

von
Stefan Dickopf

1998

Erstgutachter:
Zweitgutachter

Prof. Dr. Maarten P. Heyn
Prof. Dr. Dietmar Stehlik



Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung in das Themengebiet Bacteriorhodopsin	1
1.2	Die Struktur des Bacteriorhodopsins	3
1.3	Funktion und Photozyklus des bR	3
1.4	Das M-Intermediat	6
1.5	Einführung in das Themengebiet Rhodopsin	7
1.6	Zielsetzung	8
2	DIE EXPERIMENTELLEN METHODEN	11
2.1	Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie	11
2.2	Die Methode der kapazitiven Kopplung	13
2.3	Das Prinzip der elektrischen Messungen	16
2.4	Der experimentelle Aufbau der Doppelblitzapparatur	18
2.5	Das Lasersystem	20
2.6	Die Analogelektronik	22
2.7	Präparation der Proben, Standardbedingungen	22
2.8	Die Blitzlichtspektroskopie	24
2.9	Auswertemethoden und Fehlerbetrachtung	26
3	THEORETISCHE BESCHREIBUNG DER DOPPELBLITZEXPERIMENTE	29
3.1	Reaktionskinetik erster Ordnung	29
3.2	Die überlagerte Kinetik der zweiten Anregung	30
4	KONTROLLEXPERIMENTE	35
4.1	Bestimmung der Anregungsstärke	35
4.2	Einfluß hoher Intensität auf das elektrische Signal	38
5	PHOTOREAKTIONEN DER INTERMEDIATE VON BACTERIORHODOPSIN	51
5.1	Die Photorückreaktion aus dem L-Intermediat	51
5.2	Die Photorückreaktion aus dem M-Intermediat	54

5.3 Zeitaufgelöste Messungen der M-bR Photorückreaktion	57
5.3.1 Optische Messungen	57
5.3.2 Elektrische Messungen	62
5.4 Die M-bR Photorückreaktion: Diskussion	67
5.4.1 Simulation der Kinetik der M-Rückreaktion	74
5.5 Zeitaufgelöste Messungen der M-Rückreaktion in der Mutante D96A	76
5.6 Photorückreaktion aus M bei der Mutante R82A	78
5.7 Zeitaufgelöste Messungen an der Mutante E204Q	80
5.8 Möglicher Beitrag der Arg-82 Seitengruppe zum Protonentransport in bR	86
5.9 Die Photoreaktion aus dem N-Intermediat	88
5.10 Die Photoreaktion aus dem O-Intermediat	90
6 DIE ALKALISCHE FORM DER MUTANTE D85N	93
6.1 Einleitung	93
6.2 Vergleich der gelben Form von D85N mit dem Wildtyp	93
6.3 Diskussion	96
7 ELEKTRISCHE MESSUNGEN AN RINDERRHODOPSIN	99
7.1 Ergebnisse	99
7.2 Diskussion	108
8 ZUSAMMENFASSUNG	113
LITERATURVERZEICHNIS	117

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Prof. Dr. Maarten P. Heyn danke ich für die interessante Themenstellung, für die konstruktiven Diskussionen und für die guten Rahmenbedingungen.

Für die intensive Betreuung während der Einarbeitung in die Präparation der Membrananlagerung und für die Übergabe der funktionstüchtigen elektrischen Apparatur möchte ich mich bei Herrn Dr. Stephan Moltke bedanken.

Besonders herzlich sei auch Herrn Berthold Borucki für die Diskussionen um das Themengebiet der Absorptionsspektroskopie und für die motivierenden Gespräche in den negativen Phasen der Arbeit gedankt.

Gedankt sei außerdem Frau Dr. Ulrike Alexiev und Herrn Dr. Harald Otto, die durch ihre Diskussionen und mit ihrem umfangreichen Wissensstand über das Thema Bacteriorhodopsin ebenfalls tatkräftig beigetragen haben.

Herrn Thorsten Mielke danke ich für die Bereitstellung der Rhodopsin-Proben und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Janos K. Lanyi vom Department of Physiology and Biophysics der University of California danke ich für die Bereitstellung der E204Q-Mutante, die interessante Ergebnisse geliefert hat.

Frau Ingrid Wallat sei gedankt für die Tips im Umgang mit biologischem Material, für die zahlreichen Handreichungen und für die Zurverfügungstellung der bR-Proben.

Herrn Rainer Küsel, Herrn Marian Luft und den weiteren Mitarbeitern des Elektroniklabors danke ich für ihre zügigen Reparaturen, den Neuanfertigungen und der Hilfestellungen in elektronischen Angelegenheiten. Herrn Detlef Müller und der Feinwerktechnik danke ich für die Küvettenherstellung und sonstigen technischen Problemlösungen.

Auch Frau Marion Kornau sei für die vielen Tätigkeiten im Institutsablauf und Schriftverkehr gedankt, die die Arbeit wesentlich erleichtert haben.

Ebenso danke ich allen übrigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biophysik, Herrn Dr. Wolfgang Behrens, Herrn Matthias Gläsel und Frau Barbara Dominguez Herradon, die ebenfalls durch das gute Arbeitsklima zum Gelingen beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt jedoch meiner lieben Frau, deren motivierende Unterstützung zum Gelingen beigetragen hat.

Dem Sonderforschungsbereich 312 sei gedankt für die guten Konditionen, die ein ungestörtes Arbeiten erlaubten.

Zuletzt sei auch dem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Dietmar Stehlik für sein Interesse gedankt.

Lebenslauf

Name: Stefan Dickopf
Geburtstag: 8.6.1967
Geburtsort: Dernbach
Adresse: Emser Straße 44
12051 Berlin
Tel.: 0 30 / 6 26 34 80
Familienstand: verheiratet seit dem 5.8.1994 mit
Helga Dickopf, geb. Stein
Tochter Katharina, geb. 9.12.97

Schulbildung:

1973-1977 Grundsule in Herschbach
1977-1983 Staatliche Realschule Dierdorf
1983-1986 Staatliches Aufbaugymnasium Montabaur

Wehrdienst:

1986-1987 StabNachschubkommando Diez

Hochschulstudium:

1987-1993 Physikstudium an der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
1989 Diplom-Vorprüfung
1992 Mündliche Diplomprüfung
1992-1993 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für
Experimentalphysik der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz bei Prof. Dr. G. Huber mit dem Titel: "Sättigungs-
spektroskopie am $^{127}\text{J}_2$ und absolute Kalibrierung bei
584 nm und 548 nm"
seit Dez. 1993 Beginn der Doktorarbeit und wissenschaftlicher
Mitarbeiter am Fachbereich Physik der Freien Universität
Berlin in der Arbeitsgruppe Biophysik von Prof. Dr.
M.P. Heyn.

Berlin, im Mai 1998