

Kapitel 4

Zusammenfassung und Ausblick

Die photoinduzierte Dynamik der Protein-gesteuerten Primärreaktionen von Bakteriorhodopsin und Phytochrom aus *Cyanobacterium Synechocystis* ist charakterisiert worden. Zur Analyse der Primärreaktionen wurden unterschiedlich spezifizierte *Pump-Probe* Absorptionsspektrometer aufgebaut, die in Kapitel 2 beschrieben sind. Die Halbwertsbreiten (FWHM) der Lichtimpulse konnten dabei im sichtbaren Spektralbereich bis 22 fs reduziert werden¹ und ermöglichen die Detektion von Wellenpaketdynamik.

In **Bakteriorhodopsin** (bR) wurde die Protein-induzierte Steuerung der Primärreaktion der all-trans zu 13-cis Isomerisierung auf einer breiten Basis modifizierter Proben in Abhängigkeit von Änderungen in der Aminosäuresequenz (Mutationen), des pH Wertes und der Ionenkonzentration untersucht. Es wurden ausschließlich zwei verschiedene Formen in Bakteriorhodopsin gefunden, die sich im Zerfall des elektronisch angeregten Zustands des Retinalchromophors unterscheiden. Die purpurne Form (Absorptionsmaximum bei 570 nm) wird durch eine Zerfallszeit der Absorption des elektronisch angeregten Zustandes (ESA) von 0,52 ps charakterisiert und die blaue Form (Absorptionsmaximum bei 600 nm) durch zwei Zerfallszeiten von 1,7 ps und 6..12 ps (Abschnitt 3.1.2). Die Ausbildung der purpurnen Form ist auf eine (negativ geladene) deprotonierte Asparaginsäure 85 (D85) und die blaue Form auf eine (nicht geladene) protonierte D85 zurückzuführen [8]. Die positive Ladung des Arginin 82 (R82) erweist sich auch bei physiologischem pH als nicht notwendig für die schnelle Zerfallszeit der

¹Die Halbwertsbreiten liegen damit im Bereich der elektronischen Dephasierungszeiten der von uns untersuchten Systeme. Zum Vergleich weisen, die bis jetzt kürzesten erzeugten Lichtimpulse, eine Halbwertsbreite (FWHM) von etwa 6 fs auf [106, 107].

ESA von 0,52 ps. Es gibt weiterhin Hinweise, dass dies auch für die negative Ladung der Asparaginsäure 212 (D212) zutrifft. Damit gehören die positive Ladung der R82 und die negative Ladung der D212 nicht zu den essentiellen Ladungen des Gegenions zur protonierten Schiff'schen Base, die die Reaktion steuern. Es konnte also gezeigt werden, dass die negative Ladung der D85, die einzige Ladung ist, die durch ihre Wechselwirkung mit dem π -Elektronensystem des Retinalchromophors eine solche Änderung der Potentialoberflächen verursacht, dass eine effiziente Reaktionskatalyse eintritt. Diese Ergebnisse liefern darüberhinaus wichtige Informationen für die quantitative theoretische Beschreibung von trans-cis Isomerisierungen.

Zur Charakterisierung der biphasischen Reaktionsdynamik in der blauen Form ergeben die Messungen am N-Intermediat ein wichtiges Resultat. Es scheint möglich zu sein, die Zeitkonstante von 1,7 ps in der blauen Form der Primärreaktion eines 13-cis Isomers zuzuordnen.

Die Komplexität der Proteinumgebung, die durch ihre verschiedenen Aminosäuren und die unterschiedliche Flexibilität von Strukturmotiven gegeben ist, eröffnet dem Protein eine Vielfalt von Wechselwirkungsmöglichkeiten. Die für die Funktion essentiellen Wechselwirkungen herauszufiltern, ist eine zentrale Herausforderung der Forschung an Proteindynamik. Mit der Zuordnung der Zerfallszeiten zu den spezifischen Ladungsverteilungen im Protein ist ein wichtiger Schritt zur Eingrenzung des Parameterraumes auf eine einzige für die Primärreaktion funktionelle Ladung gelungen.

Es wurde erstmals die photoinduzierte Primärreaktion eines **bakteriellen Phytochroms** charakterisiert und zwar des Phytochroms aus *Cyanobacterium Synchocystis* (Cph1-PCB)². Es ist ein kinetisches Modell für die Cph1-PCB P_r Form entwickelt worden (Abschnitt 3.3.6), das auf Messdaten bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen über einen breiten Abtastwellenlängenbereich beruht und im Einklang mit Messungen am "geblockten" Chromophor Cph1-PEB³ und statischen Fluoreszenzmessungen [51] steht. Es zeigt sich, dass die Reaktionsdynamik am besten mit einer Verteilung von Ratenkonstanten um den Schwerpunkt $\frac{1}{16 ps}$ beschrieben wird, die sich wahrscheinlich erst durch die Anregung des Chromophors und die Reaktion des Proteins auf diese Störung ausbildet. In Cph1-PCB P_r steht damit ein Typ der Chromophor-Protein Wechselwirkung zur Verfügung, an dem die biologische Relevanz einer Verteilung von Ratenkonstanten und die

²Der Chromophor PCB ist Phycocyanobilin.

³Der Chromophor PEB ist Phycoerythrobilin.

Ursache für deren Auftreten untersucht werden kann. Beides sind aktuelle Fragestellungen der Forschung an Proteindynamik.

Der Störung des Proteins in der P_r Form durch die elektronische Anregung des Chromophors folgt die Ausbildung eines Stokesshifts und weitere schnelle Relaxationsprozesse, die nach etwa 150 fs abgeschlossen sind. In Cph1-PCB P_r ist die Amplitude der schnellen Relaxationsprozesse und der Stokesshift viel größer als in Cph1-PEB, was darauf hinweist, dass der Ring D des offenkettigen Tetrapyrrol-Chromophors stärker mit dem Protein wechselwirkt als die Ringe A,B und C. Die Proteinumgebung in Cph1-PCB P_r unterdrückt den Einbau einer zyklischen Chromophorgeometrie des PCB's, die in Lösung zu etwa 70% auftritt und ebenso eine Chromophorgeometrie, deren elektronisch angeregter Zustand mit einer Rate von $\frac{1}{4ps}$ zerfällt (siehe Abschnitt 3.3.6 und [97]).

Aus der kritischen Diskussion der Messdaten unter Einbeziehung der in der Literatur veröffentlichten Daten liegt der Schluss nahe, dass das hier vorgeschlagene kinetische Modell auch für Haferphytochrom P_r gültig ist (Diskussion siehe Abschnitt 3.3.6). Das wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass die bei der Primärreaktion der P_{fr} Form in Cph1-PCB beobachteten Zerfallszeiten von 540 fs und 3,2 ps gut mit den Zerfallszeiten in Haferphytochrom P_{fr} übereinstimmen.

Nicht zuletzt durch das Fehlen der Struktur ist über die Chromophor-Protein Wechselwirkung und die Dynamik der Primärreaktion von Phytochrom, das zu den wichtigsten Photorezeptoren der Pflanze gehört, viel weniger bekannt als in anderen wichtigen Chromoproteinen. Die erstmalige Beschreibung der Primärreaktion des bakteriellen Phytochroms als evolutionärem Vorläufer der pflanzlichen Phytochrome erweitert das neue Forschungsgebiet, das den Vergleich der beiden Phytochromklassen betrachtet. Die Charakterisierung der Primärreaktion in bakteriellem Phytochrom gewinnt zusätzlich dadurch an Bedeutung, dass die Primärreaktion von pflanzlichem Phytochrom experimentell bei weitem noch nicht so gut erforscht ist, wie die anderer Chromoproteine und zudem kontrovers diskutiert wird.

Die kurze *Systemresponse* um 45 fs im **NOPA-NOPA Aufbau** erlaubt die zeitaufgelöste Detektion kohärenter und nichtlinearer Effekte. Durch den Aufbau eines Kerrgating Spektrometers im *Pump-Probe* Aufbau wurde es möglich, den Zeitnullpunkt der Absorptionsdifferenzsignale auf ± 10 fs und die *Systemresponse* auch unterhalb von 80 fs auf etwa 8% genau zu bestimmen (Abschnitt 2.6). Dadurch konnten nichtlineare Effekte in dem Absorptionsdifferenzsignal identifiziert und vom Probensignal abgetrennt werden. Sowohl in Cph1-PCB P_r als

auch in Cph1-PEB wurde eine kohärente Wellenpaketdynamik nachgewiesen. Es wurde aber kein direkter Einfluss auf die Isomerisierung durch sie beobachtet. Kohärente Wellenpaketdynamik kann Informationen über die Schwingungseigenzustände im elektronisch angeregten Zustand, die Form der Potentialoberfläche und die Chromophor-Protein Wechselwirkung liefern und ist gerade Gegenstand intensiver Forschung (SFB 450).