

Zusammenfassung

Motivation

Ein zentrales Thema in den Biowissenschaften sind Proteinreaktionen, da sie in alle Prozesse des Lebens eingebunden sind. In diesem Rahmen hat Bakteriorhodopsin seine Relevanz als Modellprotein. Die daran erlernten Methoden und das erlangte Wissen können auf andere komplexe und physiologisch relevante Proteine übertragen werden. Die Reaktionen in Bakteriorhodopsin (bR) sind schon lange Gegenstand intensiver Forschung, um die Abläufe während des Photozyklus bis ins kleinste Detail zu verstehen. Ein wichtiges Detail jedoch - wie beginnt der Photozyklus - war bisher nicht zweifelsfrei geklärt und wird in der Literatur zunehmend kontrovers diskutiert. Daraus ergibt sich die äußerst aktuelle und konkrete Fragestellung nach dem zeitlichen Ablauf der Isomerisierung.

Es ist schon sehr lange bekannt, dass eine all-trans \rightarrow 13-cis-Isomerisierung in dem Zeitfenster zwischen der Photoanregung und dem Photozyklusprodukt K stattfindet. Aber um die strukturelle Dynamik der Chromophorisomerisierung zeitlich aufzulösen, hatten die schwingungsspektroskopischen Untersuchungen (IR und RR) bisher nicht die ausreichende Zeitauflösung, konnten den entscheidenden Spektralbereich nicht abdecken oder besaßen ein zu geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Durch die vorliegende Arbeit wird diese experimentelle Lücke geschlossen und obige Frage beantwortet. Die zentralen Ergebnisse wurden in *Science* veröffentlicht [Her2002].

Experimenteller Aufbau

Das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute fs-IR-Absorptionsspektrometer hat eine Zeitauflösung von 200 fs und einen durchstimmbaren Spektralbereich zwischen 900 und 2000 cm^{-1} für den infraroten (IR) Abtastpuls. Das apparative Rauschen beträgt nach einer Messzeit von 14 s 0,1 mOD (RMS). Mit der Anregungs-Abtast-Methode wird die transiente Absorption bei einer Wiederholfrequenz von 0.7 kHz gemessen.

Mit einem Aufbau aus zwei optisch-parametrischen Verstärkungsstufen (OPA) werden intensive nahinfrarote Pulse (1200 bis 1900 nm) erzeugt, die in einem AgGaS₂-Kristall durch Differenzfrequenzerzeugung breitbandige IR-Pulse ($\Delta\tilde{\nu} = 100 \text{ cm}^{-1}$ (FWHM)) für das Abtasten der bR-Probe generieren. Gleichzeitig werden zur Anregung der Probe im Absorptionsmaximum (570 nm) des elektronischen Grundzustands BR₅₇₀ Laserpulse von 100 fs Länge (FWHM) mit einem nichtkollinearen (N)OPA erzeugt. Die IR-Pulse werden hinter der Probe spektral aufgeweitet und treffen auf zwei Detektorzeilen mit jeweils zehn Elementen, so dass innerhalb eines Abtastpulses bei 20 Wellenzahlen simultan Daten aufgenommen werden können.

Hintergrund

Nach dem allgemein akzeptierten einfachen Modell von Dobler et al. und von Mathies et al. [Dob1988; Mat1988] entsteht beim Übergang vom elektronisch angeregten Zustand in den ersten elektronischen Grundzustand mit 0,5 ps sowohl das Photoprodukt J als auch, entsprechend der Quantenausbeute von 64 % der Ausgangszustand BR₅₇₀. Der J-Zustand geht mit 3 ps in den K-Zustand über [Pol1986]. Durch zeitaufgelöste und statische FTIR-Spektroskopie [Bra1982] bzw. mit der Resonanz-Raman-Spektroskopie [Doi1991] kann im K-Zustand die Chromophorkonfiguration eindeutig als 13-cis-Konfiguration identifiziert werden [Smi1987]. Die Untersuchungen von Atkinson et al. mit zeitaufgelöster CARS-Spektroskopie (Coherent Anti-Stokes-Raman Scattering) [Atk2000] widersprachen dem gängigen Modell; demnach geschieht die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung später als die J-Bildung, also erst mit der K-Entstehung.

Ergebnisse

Es werden erstmals die direkten Markerbanden für die isomerisierte 13-cis-Konfiguration in dem C-C-Streckschwingungsbereich und die Banden des ersten Photoprodukts anhand des C=C- und C=NH-Streckschwingungsbereichs mit genügend hoher Zeitauflösung verfolgt.

Die starken Bleichsignale bei 1529 cm⁻¹ und die breiten positiven Absorptionsdifferenzen bei 1515 cm⁻¹ stammen von den in-Phase schwingenden C=C-Bindungen des Chromophors. Bei 1511 cm⁻¹ wird die Entstehung des ersten Photozyklusprodukts (J) mit 0,5 ps angezeigt. Diese dem J-Zustand zugeordnete C=C-Streckschwingung hat in Übereinstimmung mit den Experimenten im sichtbaren Spektralbereich ein rotverschobenes Absorptionsmaximum. Sie entsteht simultan zum Zerfall des elektronisch angeregten Zustands und zerfällt mit 2 bis 3 ps. Die C=C-Streckschwingung des K-Intermediats wird bei 1515 cm⁻¹ gefunden, was in Übereinstimmung mit den RR-Messungen steht.

In der Fingerprint-Region um 1200 cm⁻¹ absorbieren die C-C-Streckschwingungen, die als bedeutende Markerbanden für den Nachweis der all-trans- und der 13-cis-Chromophorkonfiguration entscheidend sind. Die 13-cis-C₁₄-C₁₅-Bande bei 1194 cm⁻¹ entsteht mit 0,5 ps, was beweist, dass die Isomerisierung und die J-Entstehung simultan ablaufen. Das typische all-trans- zu 13-cis-Absorptionsdifferenzmuster ist schon zu frühen Stufen des photoinduzierten Übergangs vorhanden und bleibt unverändert. Dies wird durch den Vergleich des 1 ps-Absorptionsdifferenzspektrums mit dem 12 ps-Spektrum und dem 15 ns-Spektrum [Röd1999a] im Fingerprint-Bereich belegt. Die Vermutung, dass zwischen J und K die Isomerisierung stattfindet, wird dadurch widerlegt.

Die all-trans-C=NH-Streckschwingungsbande des Chromophors bei 1640 cm⁻¹ verschiebt sich innerhalb von 1 ps in den Bereich zwischen 1600 und 1620 cm⁻¹. Die Verschiebung der Absorptionsbande aufgrund der Isomerisierung zeigt die veränderte Umgebung der Schiffchen Base an. Diese Beobachtungen im C=NH- und C=C-Streckschwingungsbereich

sind konsistent mit früheren Ergebnissen [Dil1998; Dil1995].

Interessanterweise verläuft in allen charakteristischen Spektralbereichen der Rückgang der Bleichsignale (bei 1200, 1529, 1640 cm^{-1}) mit einer Zeitkonstante von 1 bis 2 ps deutlich langsamer ab, als die Produktentstehung mit 0,5 ps. Die Modellerwartung, dass nach der Reaktionsverzweigung der Produktzustand J und das Edukt BR₅₇₀ gleichzeitig entstehen, kann nicht erfüllt werden. Hierfür ist eine Erweiterung des Reaktionsmodells um einen transienten Zustand BR* für die all-trans-Moleküle zwischen S₁ und BR₅₇₀ erforderlich. Dem BR*-Zustand werden im Spektrum die Absorptionsbanden von heißen all-trans-Schwingungsübergängen zugeordnet, diese sind gegenüber den Schwingungen des Grundzustands bis zu 30 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen hin verschoben. Die anschließende Schwingungsrelaxation (Abkühlung) läuft mit 1-2 ps ab.

Das Protein bR.5.12 hat durch seinen geblockten Retinalchromophor einen langlebigen elektronisch angeregten Zustand, dessen Lebensdauer anhand der C=C-Streckschwingung im S₁-Zustand bei 1570 cm^{-1} mit ~ 17 ps bestimmt wurde. Entgegen der Erwartung ist eine zusätzliche Zeitkonstante von 2 ps für die Beschreibung der Dynamik in den Spektralbereichen der Amid-Schwingungen notwendig. Es ist bemerkenswert, dass diese Absorptionsbanden, die diese 2 ps-Dynamik zeigen, nicht mit 17 ps zerfallen, sondern über einen Zeitraum von mindestens 150 ps bestehen bleiben. Bei der Analyse des gleichen Spektralbereichs im bR-Wildtyp wird auch dort eine besondere Dynamik festgestellt. Da sich beide Proteine nur durch ihren Chromophor unterscheiden, ist es möglich, dass sie die gleiche photoinduzierte Proteinreaktion unabhängig von einer Isomerisierung zeigen. Beim Vergleich der S₁-Schwingungsspektren des bR-Wildtyps und des bR5.12-Moleküls wird eine große Übereinstimmung festgestellt, was beweist, dass während der S₁-Lebensdauer keine Isomerisierung im bR-Wildtyp geschieht.

Abschließend bleiben noch Fragen zu der Dynamik des S₁-Zustands offen, die mit einer höheren Zeitauflösung interessante Erkenntnisse und Vergleichsmöglichkeiten zu den theoretischen Modellen erbringen könnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben die Isomerisierung in der Primärreaktion zeitlich zweifelsfrei eingeordnet und durch den Nachweis von heißen Schwingungsbanden das bisherige Potentialbild erweitert. Somit konnte der Anfang des Photozyklus aufgeklärt werden.