

**Die Orientierung des elektronischen  
Übergangsdipolmoments in stationären und  
transienten Chromophorzuständen der  
lichtgetriebenen Protonenpumpe  
Bacteriorhodopsin**

Gleichlicht- und zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie mit  
linear polarisiertem Licht an orientierten Purpurmembranen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

eingereicht im  
Fachbereich Physik  
der  
Freien Universität Berlin

von

Berthold Borucki

1998

Erstgutachter: Prof. Dr. Maarten P. Heyn  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Möbius

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung in das biologische System Bacteriorhodopsin und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
1.1	Vorkommen und physiologische Relevanz . . . . .	1
1.2	Struktur . . . . .	1
1.3	Spektroskopische Charakterisierung und Funktion . . . . .	3
1.4	Transiente Chromophororientierungen – Zielsetzung der Arbeit . . . . .	6
<b>2</b>	<b>Mathematische und physikalische Grundlagen</b>	<b>9</b>
2.1	Mathematische Beschreibung der Kinetik . . . . .	9
2.1.1	Die Absorption als „Observable“ der Kinetik . . . . .	10
2.1.2	Die Singulärwertzerlegung . . . . .	11
2.2	Physikalische Grundlagen . . . . .	12
2.2.1	Die Wechselwirkung von Licht mit Materie in der Dipolnäherung . . . . .	12
2.2.2	Absorptionsanisotropie eines orientierten uniaxialen Systems . . . . .	13
2.2.3	Makroskopische Betrachtung der Lichtausbreitung im Medium . . . . .	15
2.2.4	Die Kramers–Kronig–Relationen . . . . .	17
2.2.5	Lineare Doppelbrechung . . . . .	19
2.3	Die Orientierung von Membranfragmenten . . . . .	20
2.3.1	Mechanische Orientierung . . . . .	21
2.3.2	Orientierung im elektrischen Feld . . . . .	22
2.3.3	Magnetische Orientierung . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Experimentelle Durchführung</b>	<b>25</b>
3.1	Probenherstellung . . . . .	25
3.1.1	Immobilisierung . . . . .	25
3.1.2	Orientierung im Magnetfeld . . . . .	26
3.1.3	Orientierung durch anisotropes Quellen . . . . .	27
3.1.4	Präparation bestimmter Chromophorzustände . . . . .	28
3.1.5	Ausbleichen des Chromophors . . . . .	29
3.2	Gleichlichtmessungen . . . . .	30
3.2.1	Spektrophotometrische Messungen . . . . .	31
3.2.2	Messungen in der Blitzlichtapparatur . . . . .	32
3.2.3	Photostationäre Messungen . . . . .	33
3.3	Zeitaufgelöste Messungen . . . . .	34
3.3.1	Der Meßstrahlengang . . . . .	35
3.3.2	Lasersystem und Anregungsstrahlengang . . . . .	35
3.3.3	Steuerung und Datenaufnahme . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Formale mathematische Beschreibung des Meßsignals und Auswertungsansätze</b>	<b>39</b>
4.1	Die Polarisationsabhängigkeit des Meßsignals . . . . .	39
4.1.1	Gleichlichtmessung . . . . .	39
4.1.2	Zeitaufgelöste Messung . . . . .	41
4.2	Analyse von Absorptionsänderung und Lineardichroismus . . . . .	42
4.2.1	Allgemeine Formulierung und Matrizendarstellung . . . . .	42

4.2.2	Lösungsansatz I . . . . .	45
4.2.3	Anwendung auf die frühen Intermediate im Photozyklus . . . . .	47
4.2.4	SVD-Analyse . . . . .	49
4.2.5	Lösungsansatz II . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Stationäre Chromophorzustände</b>	<b>55</b>
5.1	Der lichtadaptierte Zustand und chromophorfrem Membranen . . . . .	55
5.1.1	Darstellung der Ergebnisse . . . . .	55
5.1.2	Die Beiträge zum Brechungsindex von Purpormembranen . . . . .	57
5.2	Die Licht-Dunkel-Adaptation . . . . .	59
5.3	Purpormembranen in anisotrop gequollenen Gelen . . . . .	60
5.4	Der blau-pink Übergang . . . . .	64
5.5	Der photostationäre M-Zustand . . . . .	67
5.6	Übersicht zur Chromophororientierung stationärer Zustände . . . . .	70
<b>6</b>	<b>Zeitaufgelöste Kontrollexperimente</b>	<b>73</b>
6.1	Kontrolle der isotropen Anregung . . . . .	73
6.2	Korrektur bei nicht perfekter isotroper Anregung . . . . .	74
6.3	Einfluß der koaxialen Anregungskomponente . . . . .	77
6.4	Der grüne Helium-Neon-Laser als Meßlichtquelle . . . . .	79
6.5	Diodenlaser als Meßlichtquelle . . . . .	81
6.5.1	Photostationäres Gleichgewicht und Überlagerung der L-Photorückreaktion . . . . .	81
6.5.2	Geeignete Meßbedingungen und Systeme . . . . .	82
6.5.3	Artefakte durch Licht-Dunkel-Adaptation . . . . .	84
<b>7</b>	<b>Die frühen Photozyklusintermediate</b>	<b>89</b>
7.1	Experimente am nativen System: Magnetisch orientierte PM . . . . .	89
7.2	Experimente am nativen System: PM in anisotrop gequollenen Gelen . . . . .	97
7.3	Experimente am modifizierten System: Die Mutante D96A . . . . .	100
7.3.1	Standardbedingungen: Neutraler pH-Wert und Zimmertemperatur . . . . .	100
7.3.2	Effekte im schwach sauren Milieu bei Zimmertemperatur . . . . .	106
7.3.3	Temperatureffekt im schwach sauren Milieu . . . . .	110
7.4	Ergebnisübersicht zu den frühen Intermediaten . . . . .	113
7.5	Diskussion der Ergebnisse und des methodischen Ansatzes . . . . .	116
7.5.1	Die transienten Änderungen der linearen Doppelbrechung . . . . .	116
7.5.2	Die Intermediatsspektren und deren zeitlicher Verlauf . . . . .	117
7.5.3	Die Reorientierung des Übergangsdipolmoments . . . . .	120
<b>8</b>	<b>Die späten Photozyklusintermediate</b>	<b>123</b>
8.1	Experimente unter alkalischen Bedingungen: Das N-Intermediat . . . . .	123
8.2	Experimente im schwach sauren Milieu: Das O-Intermediat . . . . .	131
8.2.1	Messungen bei niedriger Temperatur . . . . .	131
8.2.2	Temperaturabhängigkeit im langwelligen Spektralbereich . . . . .	136
8.3	Ergebnisübersicht zu den späten Intermediaten . . . . .	137
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>139</b>

## Danksagung

Bei allen, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu bewältigen und zu Ende zu führen möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Maarten P. Heyn für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe auf dem Gebiet der Biophysik interessante Forschung zu betreiben.

Mein Dank richtet sich auch an Herrn Dr. Harald Otto, der diese Arbeit mitbetreut hat und mir wertvolle Erfahrungen zur polarisierten Blitzlichtspektroskopie vermittelt hat.

Herrn Dr. Stefan Dickopf bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Unzählige experimentelle und softwaretechnische Probleme konnten durch seine Hilfe überwunden werden. Zur Durchführung der zeitaufgelösten Messungen stellte er mir freundlicherweise sein Meßprogramm zur Verfügung. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Christian Zscherp, der mir die Blitzlichtapparatur kompetent übergeben hat und mir so die Einarbeitung wesentlich erleichtert hat. Von seiner soliden Aufbauarbeit durfte ich bei den Experimenten zehren.

Herrn Joachim Kappert danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei den Methoden zur Membranorientierung und auch bei den gemeinsamen Rechnungen, die mich motiviert haben, die Ansätze weiter zu verfolgen. Ebenso bin ich ihm sehr dankbar, daß er einige, für mich sehr nützliche, mechanische Arbeiten durchgeführt hat.

Frau Ingrid Wallat danke ich für die Purpurmembranen und die nützlichen Hinweise zum präparativen Arbeiten.

Dank aussprechen möchte ich auch meinen Kollegen Herrn Dr. Wolfgang Behrens, Herrn Thorsten Mielke, Herrn Matthias Gläsel, Frau Barbara Dominguez Herradon und Herrn Thomas Pöhlmann für ihre Hilfsbereitschaft und so manches aufbauende Gespräch.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Stephan Moltke für sein Interesse und seinen freundschaftlichen Rat.

Meinen Eltern danke ich herzlich für die ihre Unterstützung und ihren Zuspruch.

Diese Arbeit wurde durch Personal- und Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (He1382/7-1, He1382/7-2) und der Ständigen Kommission für Forschung und Wissenschaftlichen Nachwuchs (FNK) der Freien Universität Berlin gefördert.



## Lebenslauf

---

Geburtsdatum: 28. August 1965  
Geburtsort: Freiburg i. Brsg.  
Familienstand: ledig  
Eltern: Ludwig Borucki, Diplomphysiker  
Gisela Borucki geb. Neumann, Gymnasiallehrerin

1971 - 1975 Besuch der Bodensee-Grundschule in Friedrichshafen  
1975 - 1984 Gymnasium in Markdorf i. Bd.  
Juni 1984 Abitur mit den Leistungskursen Physik und Mathematik

Oktober 1984 Einberufung zur Bundeswehr  
Februar 1985 Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer  
Februar 1985 -  
Mai 1986 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Meersburg

Oktober 1986 Aufnahme des Diplom-Studiums der Physik an der  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

November 1988 Vordiplom

Oktober 1990 -  
April 1991 Hauptpraktikum in der Arbeitsgruppe von Prof. Mehlhorn

Mai 1991 -  
Juni 1992 Diplomarbeit in der Abteilung von Prof. Mehlhorn  
zum Thema „Alignment von Magnesium<sup>+</sup>(L<sub>3</sub>) an der  
Ionisationsschwelle nach Elektronenstoß“

November 1992 Abschluß des Studiums mit der Diplomprüfung

Seit August 1993 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am FB Physik der Freien  
Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Heyn

Berlin, im September 1998