
Retinalbasierte Ionenpumpen - Ultrakurzzeitspektroskopie der Primärreaktion in unterschiedlichen Umgebungen

Constanze Sobotta



München 2006

**Retinalbasierte Ionenpumpen -
Ultrakurzzeitspektroskopie der
Primärreaktion in unterschiedlichen
Umgebungen**

Constanze Sobotta

Dissertationsschrift
angefertigt an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Constanze Sobotta
aus München

München, den 8. November 2006

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hermann Gaub

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Februar 2007

Kurzfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Manipulation der Primärreaktion von Bakteriorhodopsin (BR). Dazu wurde die Primärreaktion mittels Ultrakurzzeit-spektroskopie im Femto- und Pikosekundenbereich eingehend untersucht und erste kohärente Kontrollexperimente an einem Modellsystem durchgeführt.

- Zuerst wurde der Einfluss der Proteinumgebung, den das Gegenion zur Schiffischen Base des Retinals (Aspartat (D) Position 85) auf die Primärreaktion von BR ausübt, untersucht. Dabei wurde BR mit Halorhodopsin (HR) (fehlendes Gegenion, Threonin (T)) und der BR-Mutante D85T verglichen. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass nur in dem Fall, wenn ein Anion exakt in einem eingeschränkten Bereich um die Position 85 lokalisiert ist, eine BR-ähnliche stationäre Absorption und eine schnelle Primärreaktion mit der BR-typischen Zeitkonstante von 0.5 ps hervorgerufen wird. Fehlt dagegen das Anion oder befindet es sich außerhalb dieses eingeschränkten Bereichs, tritt eine Primärreaktion analog zur Primärreaktion von HR mit einer biexponentiellen Kinetik von 1 bis 10 ps auf.
- Da in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der initialen Bewegungen im angeregten Zustand von BR vorliegen, wurde die Auswirkung der Anregungsdichten auf die Fluoreszenzdynamik analysiert: Bei hohen Anregungsdichten treten spektrale und dynamische Änderungen in der Fluoreszenz auf, die Mehrphotonenprozessen zugeordnet werden können. Diese Mehrphotoneneffekte erklären bestehende Diskrepanzen in der Literatur. Nur für niedrige Anregungsdichten sind lineare und native Anregungsbedingungen gewährleistet, unter denen sich ein biexponentielles Verhalten ergibt. Dabei wurde zum ersten Mal ein dynamischer Stokesshift beobachtet, der auf einen schnellen Umordnungsprozess auf der reaktiven Potentialfläche hindeutet.
- Ferner wurde der erste schnelle Prozess (<200 fs) in BR sowie in den BR-Mutanten D85T im grünen Spektralbereich untersucht. Dazu wurde BR am isosbestischen Punkt bei 534 nm erstmals im Detail analysiert, was zu einer genaueren Charakterisierung des ersten Prozesses führte. Bei dieser Wellenlänge wurde die Bildung und Auswirkung eines spektralen Loches beobachtet. Zuerst wird die Absorption aus dem angeregten Zustand sichtbar, die instantan mit der Anregung auftritt. Das Ausbleichen des Grundzustandes erscheint hier mit 50 fs verzögert. Daran schließt sich der dynamische Stokesshift an.
- Zuletzt wurde zur Vorbereitung der kohärenten Kontrolle an BR ein kohärentes Kontrollexperiment am Modellsystem Oxazin 1 realisiert. Als Kontrollziel diente die Optimierung der Grundzustandswellenpakete mit Hilfe linear gechirpter Anregungsimpulse, deren linearer Chirp durch einen computergesteuerten Impulsformer variiert wurde. Für die dominanten Schwingungsmoden bei 560 cm^{-1} und 609 cm^{-1} konnte ein optimaler Chirpparameter ermittelt werden, bei dem effizient Wellenpakete im Grundzustand erzeugt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation	1
1.1	Retinalproteine: Sehprozess	1
1.2	Bakterielle Retinalproteine: Photosynthese und Ionentransport	3
1.3	Ziel der vorliegenden Arbeit	4
1.4	Gliederung der vorliegenden Arbeit	5
2	Bedeutung und Funktion der Retinalproteine	7
2.1	Bakteriorhodopsin	9
2.1.1	Struktur	9
2.1.2	Photozyklus	11
2.1.3	Primärreaktion des Photozyklus und Modelle	14
2.2	Halorhodopsin	21
2.2.1	Struktur	21
2.2.2	Photozyklus	24
2.2.3	Modelle zur Beschreibung der Primärreaktion	26
2.3	Vergleich von BR mit HR	29
2.4	Mutante D85T	30
2.4.1	Struktur der Mutante	31
2.4.2	Eigenschaften	33
2.4.3	Photozyklus	34
2.4.4	Vergleich der Mutante D85T mit HR	35
3	Experimentelle Aufbauten und Probenpräparation	37
3.1	Experimentelle Aufbauten	37
3.2	Transiente Fluoreszenzspektroskopie	38
3.3	Transiente Absorptionsspektroskopie	40
3.3.1	Transiente Absorptionsspektroskopie mit breitbandigem Weißlichtkontinuum als Abtastimpuls	40
3.3.2	Transiente Absorptionsspektroskopie mit einem NOPA-Abtastimpuls	42
3.4	Probenkreislauf	46
3.5	Probenpräparation	46
3.5.1	Oxazin	47
3.5.2	Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin, Mutante D85T	47
3.6	Datenauswertung und Analyse	49

4 Manipulierte Pumpaktivitäten: Ultrakurzzeitspektroskopie von HR, BR und der BR-Mutante D85T	51
4.1 Stationäre Absorptionsspektroskopie	51
4.2 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich	53
4.2.1 Ergebnisse	53
4.2.2 Diskussion	61
4.3 Zusammenfassende Bemerkung	69
5 Initiale Reaktionen in Bakteriorhodopsin	71
5.1 Fluoreszenzspektroskopie	71
5.1.1 Anregungsabhängigkeit der Fluoreszenzdynamik	72
5.1.2 Fluoreszenzdynamik bei niedrigen Anregungsdichten	75
5.2 Transiente Absorptionsspektroskopie	80
5.3 Diskussion des dynamischen Stokesshifts in Bezug auf Modelle zur Primärreaktion	86
5.4 Zusammenfassende Bemerkung	89
6 Vorbereitung zur Reaktionskontrolle von BR: Kontrollexperiment an Oxazin	91
6.1 Allgemeine Beschreibung eines kohärenten Kontrollperiments	91
6.2 Oxazin 1	94
6.3 Ergebnisse und Diskussion	97
6.4 Zusammenfassende Bemerkung	103
7 Zusammenfassung	105
Literaturverzeichnis	109
Lebenslauf	141
Danksagung	143

1 Motivation

Das Sehvermögen des Menschen ermöglicht das Wahrnehmen von Bildern und Farben, wobei der zugrunde liegende Prozess ein komplexes Zusammenspiel von menschlichem Auge und Gehirn erfordert. Die Kombination aus Bildwahrnehmung und Bildverarbeitung stellt eine unvergleichliche Funktion dar, die bisher von Erfindungen technischer Apparate oder Instrumente unerreicht bleibt.

1.1 Retinalproteine: Sehprozess

Der Sehvorgang wird durch das Auftreffen von Licht in Form von Photonen auf das Auge initiiert. Die Photonen gelangen durch den dioptrischen Apparat, der aus der Hornhaut (Cornea), der Linse und dem Glaskörper (engl. vitreous gel) besteht, ins Auge (Abb. 1.1). Die Linse bündelt dabei das Licht und fokussiert es auf die Netzhaut (Retina), die sich aus drei neuronalen Schichten zusammensetzt: den Ganglienzellen, den Bipolarzellen und den Photorezeptoren (Abb. 1.2). Zunächst müssen die Photonen die Schichten aus Ganglienzellen und Bipolarzellen durchdringen, ehe sie die Photorezeptoren erreichen können (Abb. 1.2). Als Photorezeptoren fungieren Zäpfchen und Stäbchen (engl. cone und rod), wobei im menschlichen Auge der Anteil der Stäbchen überwiegt. Die Stäbchen sind für das Schwarz-Weiß- bzw. das Hell-Dunkel-Sehen bei Lichtverhältnissen in der Dämmerung und in der Nacht zuständig, während die Zäpfchen das Farbsehen unter hellen Lichtbedingungen ermöglichen.

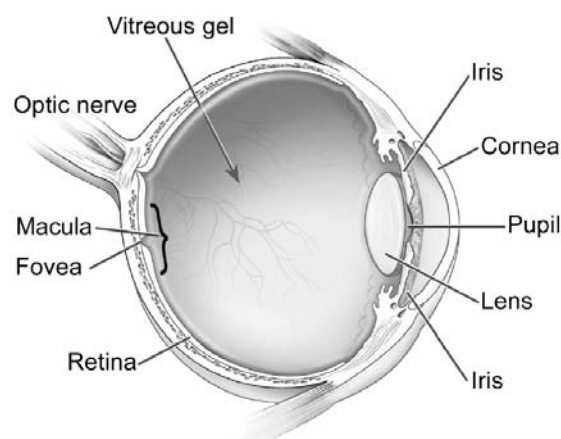


Abbildung 1.1: Schematischer anatomischer Aufbau des menschlichen Auges [1].

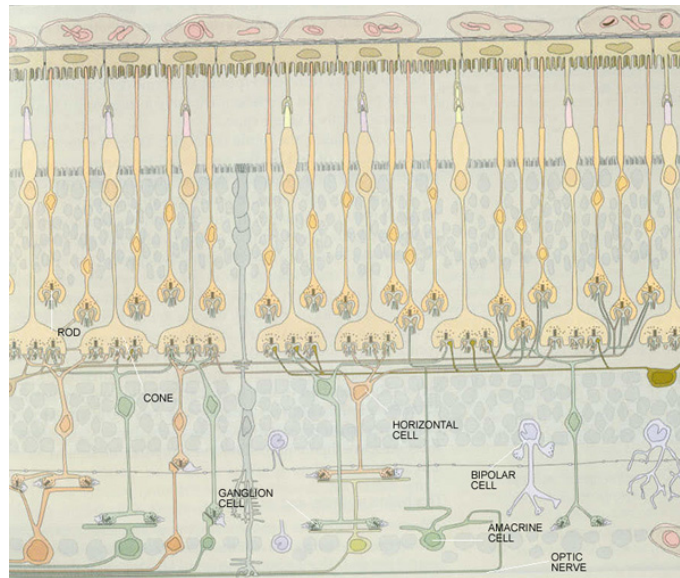


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau der Retina [2]. Das Licht gelangt im Bild von unten nach oben, zuerst über die Ganglienzellen und die Bipolarzellen auf die dahinterliegenden Photorezeptoren, die Stäbchen (rod) und Zäpfchen (cone).

Strukturell bestehen die Photorezeptorzellen aus zwei Segmenten (Abb. 1.3), dem Innensegment und dem Außensegment. Das Innensegment, mit dem der untere Teil des Photorezeptors bezeichnet wird, enthält den Nukleus und die Synapsenenden. Das Außensegment im oberen Teil setzt sich aus etwa tausend Lamellen, sogenannten Scheibchen (engl. discs), zusammen, in denen das photorezeptorische Pigment Rhodopsin konzentriert ist. Dieses Protein ist als Transmembranprotein in die Zellmembranen der Discs integriert und besteht aus dem Apoprotein Opsin und dem Chromophor Retinal. Für die Entdeckung des primären physiologischen und chemischen Sehprozesses erhielten Granit, Hartline und Wald 1967 den Nobelpreis für Medizin. Die Photonen gelangen zum Photorezeptor und werden vom Rhodopsinmolekül absorbiert [4]. Die lichtinduzierte Anregung initiiert eine *cis-trans* Isomerisierung, bei der das Retinal eine Drehung um eine zentrale Bindung durchführt. Diese Reaktion läuft sehr schnell ab und vollzieht sich auf einer Zeitskala von Femtosekunden. Die Isomerisierung als einziger lichtabhängiger Schritt im Sehprozess löst eine Kaskade von nachfolgenden chemischen Reaktionen aus. Dabei wird durch die Isomerisierung über eine Enzymkaskade eine Reaktion abhängig von der Konzentration von Guanosinmonophosphat aktiviert, die das Öffnen und Schließen der Natrium-Kanäle steuert. Das Schließen der Ionenkanäle bewirkt eine Änderung des Membranpotentials der Rezeptorzelle, die dadurch hyperpolarisiert wird. Diese Hyperpolarisation leitet ein elektrisches Signal über die Synapsen an das zentrale Nervensystem im Gehirn zur Verarbeitung und Interpretation weiter.

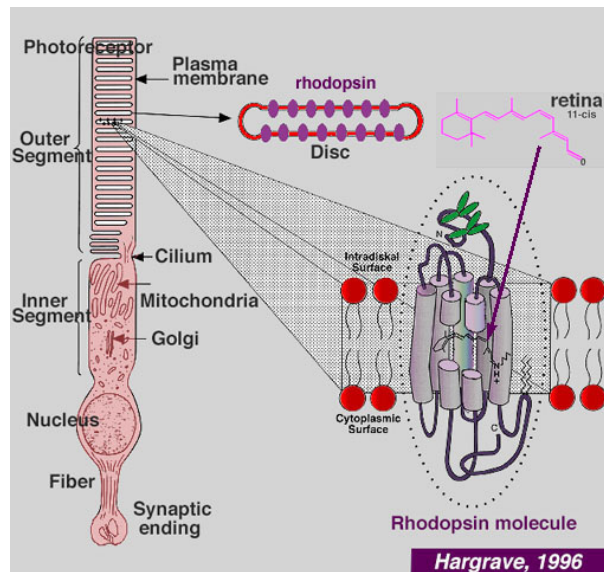


Abbildung 1.3: Links ist eine Schemazeichnung eines Photorezeptors dargestellt [3]. In dessen Außensegment befinden sich Scheibchen (discs), die die lichtsensitiven Rhodopsinmoleküle enthalten. Rechts in der Vergrößerung ist das in die Zellmembran integrierte Rhodopsinmolekül mit seinem zentralen Retinalchromophor dargestellt.

Das Rhodopsin übernimmt damit die wichtige Funktion des Photorezeptors und steuert mit seiner grundlegenden photochemischen Isomerisierungsreaktion die nachfolgenden Prozesse. Die Erfindung des Lasers in den sechziger Jahren legte die Grundlage für eine neue Untersuchungsmethode, die Laserspektroskopie (Nobelpreise für Bloembergen und Schawlow 1981 und Zewail 1999). Diese Methode ermöglichte nun, zeitaufgelöste Laserspektroskopie an Rhodopsin durchzuführen, um den Isomerisierungsvorgang und seinen Mechanismus aufzuklären.

1.2 Bakterielle Retinalproteine: Photosynthese und Ionentransport

Bei der biochemischen Reaktion im Auge erfolgt eine Deaktivierung des Rhodopsinmoleküls, indem es in das Apoprotein Opsin und in ein freies Retinal zerfällt [5]. Dieser irreversible Umwandlungsprozess erschwert die Aufklärung der Struktur von Rhodopsin und seiner Funktionsweise im Auge. Im Stammbaum der Rhodopsine existieren jedoch zahlreiche Vertreter dieser Spezies [6], zu deren Familie auch das wohl am besten untersuchte Protein Bakteriorhodopsin (BR) aus dem Archaeon *Halobacterium salinarum* gehört. BR weist eine große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Rhodopsin im menschlichen sowie tierischen Auge auf [7–13]. Dabei fungiert es im Archaeon ebenfalls als Photorezeptor, in dessen Inneren sich ein Retinalchromo-

phor befindet. Die Absorption eines Photons hat auch hier eine Isomerisierung des Retinals, allerdings von *trans* nach *cis*, zur Folge. Die Isomerisierung initiiert einen reversiblen katalytischen Photozyklus, der mit dem Transport eines Protons aus der Zelle verbunden ist. BR ist nicht nur wichtig für die Aufklärung der initialen Schritte im Sehprozess, sondern auch von allgemeinem wissenschaftlichen Interesse, da es als Modellsystem für die Photosynthese, für Ionenpumpen sowie für transmembrane Rezeptoren mit 7 Helices dient.

Freies Retinal kann in Lösung unspezifisch um verschiedene C-C-Bindungen isomerisieren, wobei jedoch nur geringe Quantenausbeuten und kleine Reaktionsraten erreicht werden [14–17]. Dagegen erfolgt beim Retinal, das im Protein BR gebunden ist, eine Isomerisierung spezifisch um die C₁₃=C₁₄-Bindung mit einer deutlich größeren Quantenausbeute und Reaktionsrate [18–26]. Damit übt die Proteinumgebung und ihre Wechselwirkung mit dem Chromophor einen wesentlichen Einfluss auf die photochemische Reaktion des Retinals aus.

Zu den wesentlichen offenen Fragestellungen gehören die katalytische Rolle des Proteins auf die Primärreaktion, die Bedeutung des ersten Prozesses auf der angeregten Potentialfläche <200 fs sowie die Manipulation der Primärreaktion mit Hilfe kohärenter Kontrolle. Bisher konnte noch kein Konsens bezüglich des exakten molekularen Mechanismus in BR erzielt werden, so dass immer noch kontroverse Diskussionen über die initialen Schritte in der Primärreaktion geführt werden.

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit wurden die primären photochemischen Prozesse des Retinals in BR nach den folgenden Gesichtspunkten untersucht:

1. Der katalytische Einfluss der Proteinumgebung, den das Gegenion zur Schiffchen Base des Retinals (Aspartat (D) Position 85) auf die Primärreaktion von BR ausübt, wird untersucht und mit den Primärreaktionen von Halorhodopsin (HR) (fehlendes Gegenion, Threonin (T)) und der BR-Mutante D85T verglichen.
2. Die initialen Bewegungen auf der angeregten Potentialfläche wurden gleichzeitig mit zwei verschiedenen Spektroskopiemethoden, der zeitaufgelösten transienten Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie, im Femtosekundenbereich charakterisiert.
3. Außerdem wurden erste kohärente Kontrollexperimente an Oxazin durchgeführt, die einen völlig neuen experimentellen Ansatz zum Verständnis einer photochemischen Reaktion verfolgen. Diese Experimente dienen als Vorexperimente für die in Zukunft geplanten kohärenten Kontrollexperimente an BR.

1.4 Gliederung der vorliegenden Arbeit

Die vorgelegte Arbeit gliedert sich inhaltlich folgendermaßen:

- Kapitel 2: Zunächst wird eine Einführung in die Bedeutung und Funktion der Retinalproteine im Archaeon *Halobacterium salinarum* gegeben, insbesondere über BR, HR und die artifizielle BR-Mutante D85T.
- Kapitel 3: Es folgt die Beschreibung der experimentellen Aufbauten für die zeitaufgelösten transienten Absorptionsmessungen, die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen und die kohärenten Kontrollexperimente sowie die Erläuterung der Probenpräparation und der Datenauswertung.
- Kapitel 4: Anschließend werden die Experimente vorgestellt, die sich mit den langsamen Bewegungen im Pikosekundenbereich auf der angeregten Potentialfläche von BR befassen. In diesem Zusammenhang wird der Einfluss der Proteinumgebung auf die Isomerisierung des Retinals anhand von BR, HR und der BR-Mutante D85T untersucht.
- Kapitel 5: Im Gegensatz zum vorherigen Kapitel wird hier auf die initialen Bewegungen im angeregten Zustand mit Hilfe von zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie und transienter Absorptionsspektroskopie eingegangen. Dabei wird die Auswirkung der Anregungsintensitäten auf die primäre Fluoreszenzdynamik untersucht.
- Kapitel 6: Abschließend werden die Ergebnisse eines kohärenten Kontrollperiments am Laserfarbstoff Oxazin 1 präsentiert, bei dem die Wellenpaketsbewegungen abhängig vom linearen Chirp im Anregungsimpuls untersucht werden. Dieses Experiment dient als Vorbereitung zur kohärenten Kontrolle an BR.

2 Bedeutung und Funktion der Retinalproteine

Im Laufe der Evolution haben sich zelluläre Lebewesen entwickelt, die je nach Struktur ihrer RNA in drei verschiedene Domänen klassifiziert werden können: Eukaryoten, Bakterien und Archaeen (Archaea, früher auch als Archaeobakterien bezeichnet) [27]. Bei den Archaeen handelt es sich um einfache Zellen, die weder einen Kern



Abbildung 2.1: Salzsee mit der charakteristischen Purpurfarbe der Halobakterien [28]

noch Organellen besitzen. Da sie teilweise auch eukaryotische Merkmale aufweisen, sind sie den Eukaryoten näher verwandt als den Bakterien. Sie bewohnen einerseits Lebensbereiche mit „normalen“ Bedingungen wie das Meer [6], Seen oder den Boden, können aber auch bevorzugt in sehr extremen Milieus leben: äußerst saure Bedingungen (pH-Wert bei 0), bei sehr hohen Temperaturen um die 100 °C oder in gesättigten Salzlösungen [29–31].

Zu den bekanntesten Vertretern der Archaeen zählen die Halobakterien mit ihrer charakteristischen Purpurfarbe (Abb. 2.1). Sie sind in der Natur weit verbreitet und leben unter hoher Sonneneinstrahlung in gesättigten salzigen Lebensräumen, die eine Salzkonzentration über 4 M NaCl aufweisen. Das *Halobacterium salinarum* [32] (früher *Halobacterium halobium*) hat in diesen extremen Umweltbedingungen neben der aeroben Atmung zwei anaerobe Prozesse, die Argininfermentation [33] und die

2 Bedeutung und Funktion der Retinalproteine

Photosynthese [34] entwickelt. Unter dem Mikroskop erscheint das *Halobacterium salinarum* stäbchenförmig mit einer Länge von $5\ \mu\text{m}$ und einer Breite von $0.5\ \mu\text{m}$. In seiner Zellmembran sind verschiedene Transmembranproteine eingebettet, die unterschiedliche Funktionen übernehmen (Abb. 2.2). Hierzu zählen vier verwandte Re-

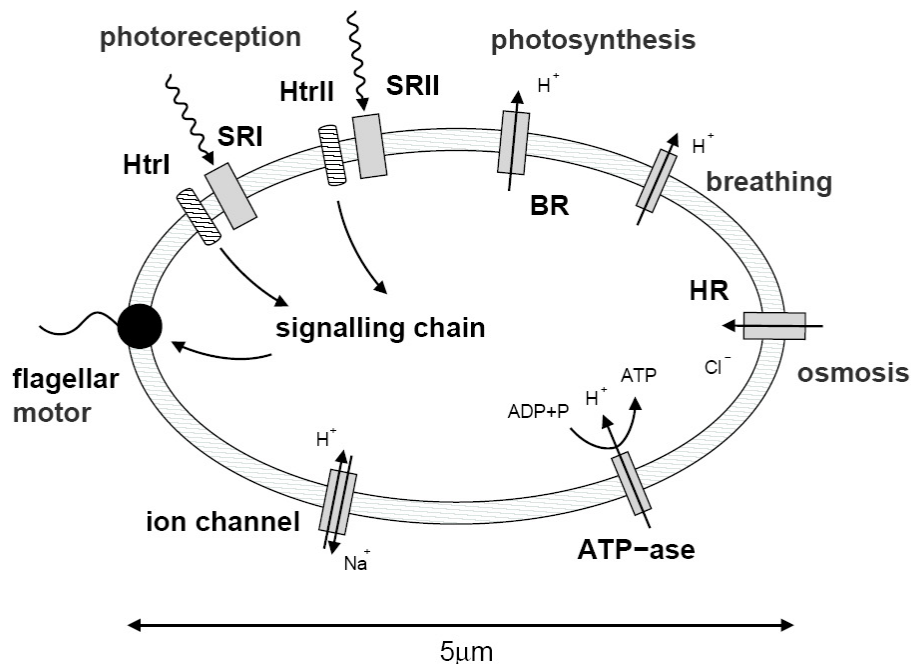


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des *Halobacterium salinarum* mit seinen wichtigsten Membranuntereinheiten [35]. In der Zellmembran befinden sich verschiedene Transmembranproteine: Bakteriorhodopsin (BR), Halorhodopsin (HR), Sensorrhodopsin I (SRI) und Sensorrhodopsin II (SRII), die ATP-ase, ein Flagellenmotor, sowie weitere Ionenkanäle.

tinalproteine (Bakteriorhodopsine, Halorhodopsine, zwei Arten von Sensorrhodopsinen) sowie Ionenkanäle, ATP-asen zur ATP-Bildung und ein Flagellenmotor, mit dessen Hilfe sich die Zelle schwimmend fortbewegen kann. Diese vier Retinalproteine bestehen aus jeweils sieben α -Helices, die untereinander mit kurzen Schleifen verbunden sind. Die Helices sind in einer ringförmigen Struktur angeordnet und umgeben als zentralen Chromophor ein Retinal, das kovalent über eine Schiffsbasis an ein Lysin der Helix G gebunden ist (Abb. 2.3 und Abb. 2.4).

Das Bakteriorhodopsin (BR), eine lichtgetriebene Protonenpumpe, ermöglicht dem Archaeon mit Licht als einzig verfügbarer Energiequelle zu wachsen. Nach Absorption eines Photons transportiert BR ein Proton durch die Membran. Dabei gelangt ein Proton von der zytoplasmatischen Seite auf die extrazelluläre Seite [36, 37]. Die lichtgetriebene Protonenpumpe wandelt damit Lichtenergie in einen Protonengradienten über die Zellmembran um, dessen protonenmotorische Kraft 280 bis 300 mV

erreichen kann [38, 39]. Die Potentialdifferenz über der Membran kann unter anderem zur Bildung von ATP mit Hilfe der ATP-Synthase verwendet werden [40]. Neben BR befindet sich Halorhodopsin (HR) in der Zellmembran, das eine lichtgetriebene Chloridionenpumpe darstellt. HR transportiert Chloridionen in die Zelle [41], um beim Wachstum den osmotischen Druck zu regulieren und die hohe interne Salzkonzentration zu erhalten [42]. Ferner existieren zwei phototaktische Rezeptoren, Sensorrhodopsin I und II (SRI und SRII) [43]. Das SRI ist an der Phototaxie beteiligt [44, 45]. Es vermittelt ein Signal an den enggebundenen Komplex, das Übertragungsprotein (engl. transducer) HtrI, das im Gegenzug den Flagellenmotor aktiviert [46], um „günstiges“ Licht in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 650 nm zu suchen (photophil) und schädliches UV-Licht zu meiden (photophob). Das SRII trägt ebenfalls zur Phototaxie bei [47]. Es leitet ein Signal an den Komplex mit dem Übertragungsprotein HtrII weiter, das photophob auf blaues Licht reagiert [48–50]. In den folgenden Abschnitten wird ausführlich auf die beiden Proteine BR und HR eingegangen und eine artifizielle BR-Mutante D85T vorgestellt.

2.1 Bakteriorhodopsin

2.1.1 Struktur

Das Membranprotein BR wurde in den siebziger Jahren entdeckt [34, 58] (für Übersichtsartikel siehe folgende Veröffentlichungen [19, 59–62]).

BR mit einem Molekulargewicht von 26 kD ordnet sich in der Zellmembran in Form von Trimeren zu einem zwei-dimensionalen hexagonalen Kristall an [58, 63], die sogenannte Purpurmembra (PM). Insgesamt besteht BR aus 248 Aminosäuren [64, 65], die in der Sekundärstruktur sieben α -Helices ausbilden [66–69]. Die Helices, die über Schleifen miteinander verbunden sind, durchspannen die Membran und sind nahezu senkrecht zur Membranebene ausgerichtet (Abb. 2.3). Sie bilden einen äußeren Ring und einen inneren Ring, wobei der innere Ring einen hydrophilen Kanal definiert. Im Inneren dieses Kanals befindet sich als Chromophor ein Retinal, das den zytoplasmatischen Halbkanal (CP-Halbkanal) vom extrazellulären Halbkanal (EC-Halbkanal) trennt. Das Retinal besteht aus einer Polyenkette konjugierter Doppelbindungen von Kohlenstoffatomen und einem β -Iononring. Es liegt in einer planaren Konfiguration vor [70–72] und ist kovalent über eine protonierte Schiffische Base (C=NH⁺-Gruppe) an die ϵ -Aminogruppe des Lys216 in der Helix G gebunden (Abb. 2.4) [73–76].

In der Bindungstasche ist das Retinal zwischen drei Tryptophanresten, Trp86, Trp182, Trp189 und einem Tyrosin Tyr189 eingebettet. Außerdem befinden sich in der näheren Umgebung die geladenen und polaren Aminosäuren Asp85, Asp212 und Arg82. Sie bilden einen sogenannten Gegenionkomplex [77], mit dem die Schiffische Base elektrostatisch wechselwirkt [78].

Im CP und im EC Kanal befinden sich mindestens sieben Wassermoleküle, die eine bedeutende Rolle für den vektoriellen Protonentransport übernehmen [68, 69, 79].

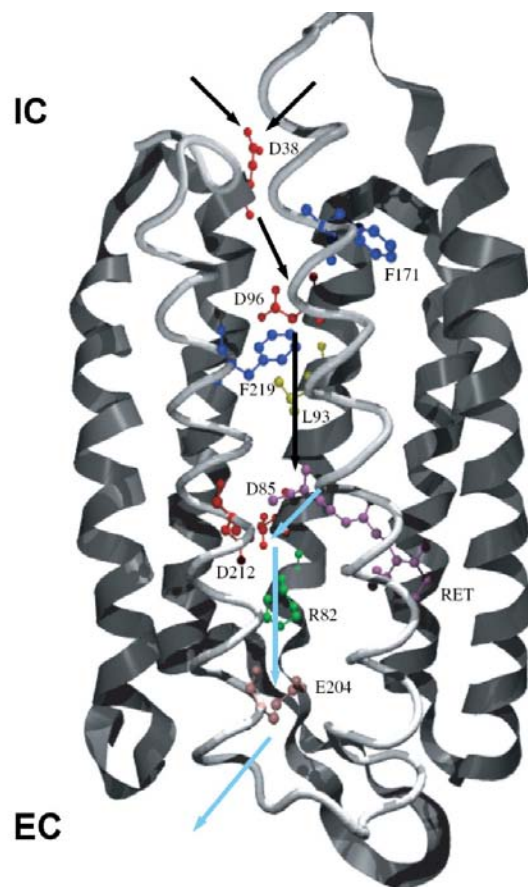


Abbildung 2.3: Protonentransport in BR [51]. Die Richtung des Transports erfolgt von der intrazellulären Seite (IC) zur extrazellulären Seite (EC). Eingezeichnet sind das Retinal (RET) und die wichtigsten Aminosäuren, die am Protonentransport beteiligt sind: Asp38 (D38), Asp96 (D96), Phe171 (F171), Phe219 (F219), Asp212 (D212), Asp85 (D85), Arg82 (R82) und Glu204 (E204) [18, 52–57]. Die zeitliche Abfolge und die Richtung der wesentlichen Protonentransferschritte sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Es bildet sich ein kooperatives Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen den Wassermolekülen und den am Transport beteiligten Gruppen (Asp212, Trp86, Asp85 und der Schiffsbasis) aus [80, 81].

Um den funktional aktiven Photozyklus zu initiieren, muss BR zuerst aus dem stabilen Dunkelzustand lichtadaptiert werden. Im dunkeladaptierten Zustand liegt das Retinal zu 50 bis 60 % in einer 13-*cis*, 15-*syn*-Konfiguration und zu 40 bis 50 % in einer all-*trans*, 15-*anti*-Konfiguration vor [82, 83]. Im lichtadaptierten Zustand jedoch verlagert sich dieses Gleichgewicht: das Retinal geht nahezu zu 100% in die all-*trans*, 15-*anti*-Konfiguration über [82, 84]. Nur im all-*trans* Zustand des Retinals kann BR einen effektiven Pumpprozess durchführen. Die genaue physiologische Bedeutung des dunkeladaptierten Zustandes ist allerdings noch nicht genau geklärt [85].

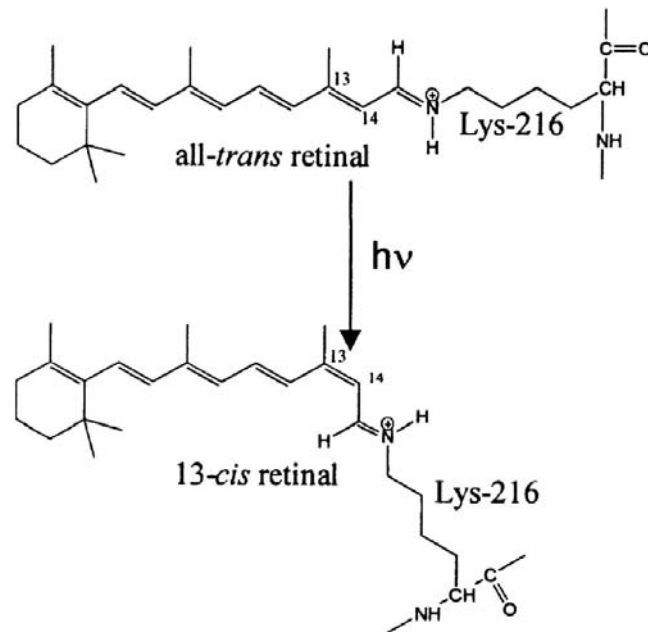


Abbildung 2.4: Retinal mit protonierter Schiff'scher Base. Nach Absorption eines Photons isomerisiert das Retinal um die $C_{13} = C_{14}$ Bindung.

2.1.2 Photozyklus

Allgemeine Beschreibung des Photozyklus

Die Absorption eines Photons setzt einen katalytischen Photozyklus in Gang, der zu einem Protonentransport aus der Zelle führt. Durch spektroskopische Untersuchungen konnten einzelne Zwischenzustände, sogenannte Intermediate, identifiziert werden und ihrer jeweiligen Funktion im Transport zugeordnet werden [88–91]. Der Photozyklus durchläuft eine Sequenz von mehreren Intermediaten, die angefangen mit I als dem frühesten Photoprodukt weiter in alphabetischer Reihenfolge bezeichnet werden (I_{460} , J_{600} , K_{590} , L_{550} , M_{410} , N_{530} , O_{640}) [36]. Die Indizes der Intermediate bezeichnen die Absorptionsmaxima der jeweiligen Intermediate in nm. Der Photozyklus von BR ist in der Abb. 2.5 dargestellt und wird im Folgenden genauer erläutert: Eine Photoanregung startet den Photozyklus mit der Primärreaktion, in der das Retinal über den Zwischenzustand I_{460} von der *all-trans* Konformation in die *13-cis* Konformation übergeht, wobei die Reaktion eine pH-unabhängige Quantenausbeute von 0.65 aufweist [18, 20–23, 92–100]. Die Isomerisierung erfolgt um die $C_{13}=C_{14}$ -Bindung (Abb. 2.4). Dieser Prozess vollzieht sich innerhalb von 500 fs [24, 101–104] mit der Bildung des Produktzustandes J_{600} [101, 102], der mit 3 bis 5 ps in den K_{590} relaxiert [24, 85, 101–103, 105]. Der Zerfall des K_{590} in das L_{550} -Intermediat läuft in 2 μ s ab, verursacht eine Verstärkung der Wasserstoffbrückenwechselwirkungen zwischen der protonierten Schiff'schen Base und dem Asp85 über ein Wassermolekül

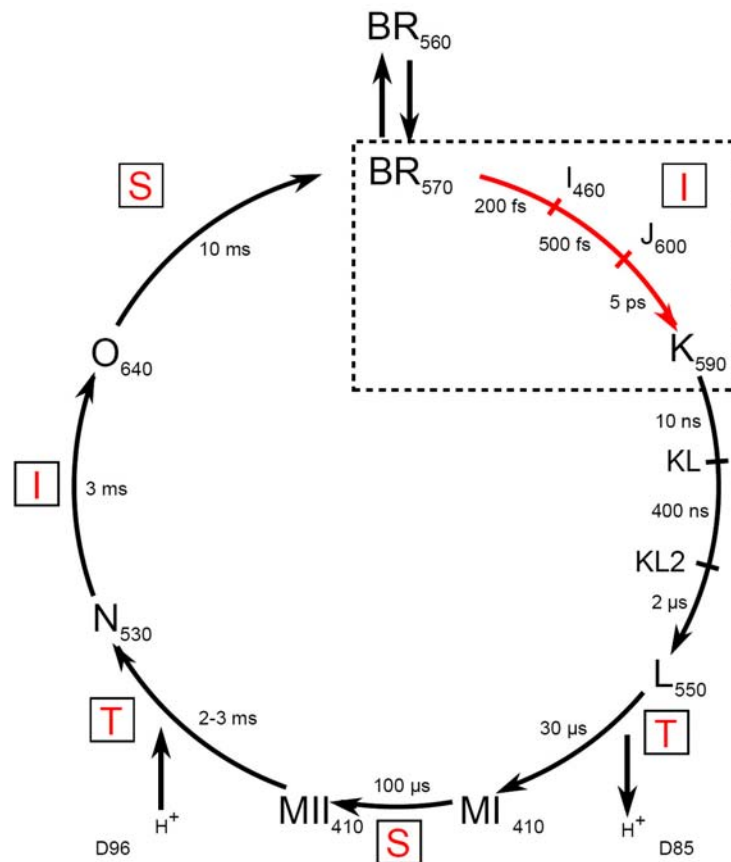


Abbildung 2.5: Photozyklus von BR nach [29]. Die Intermediate sind mit Indizes versehen, die das Absorptionsmaximum des Zustandes angeben. Kästchen mit S, T, I kennzeichnen die Prozesse im IST-Modell. Für die Initiierung des Photozyklus muss BR zunächst lichtadaptiert werden, was durch den Doppelpfeil gekennzeichnet ist. Der gestrichelte Kasten umfasst die Primärreaktion im Femto- und Pikosekundenbereich. Für die späteren Zeitbereiche sind die beiden wichtigsten Aminosäuren D85 (Asp85) und D96 (Asp96) angegeben, die am Photozyklus beteiligt sind [86, 87].

[106–109] und bewirkt eine Lageveränderung des Wassermoleküls [110–112]. Da die Schiffische Base einen pK_a -Wert über 13 [113] aufweist, liegt sie unter physiologischen Bedingungen protoniert vor, wohingegen Asp85 mit einem pK_a -Wert von etwa 3 deprotoniert ist. Im L-Intermediat ermöglicht die verdrillte Geometrie des Retinals (13-*cis*) ein Absenken des pK_a -Werts der Schiffischen Base, so dass ein Protonentransport von der Schiffischen Base zum Asp85 stattfinden kann. Beim Übergang von L_{550} zu MI_{410} innerhalb einiger Mikrosekunden wird daher ein Proton von der Schiffischen Base zum anionischen Protonenakzeptor Asp85 im EC-Halbkanal transferiert [114–117]. Asp85 ist die einzige interne Aminosäure, die im M-Intermediat protoniert vorliegt und für die spektrale Farbverschiebung (von violett nach blau) verantwortlich ist [97, 118]. Als Reaktion auf die Protonierung von Asp85 wird ein

Proton von Glu204 [119–122] mit Hilfe von Arg82 [53, 123, 124] dissoziiert und zur anionischen Aminosäure Glu194 transferiert [125, 126], bevor es von dort an die extrazelluläre Oberfläche [127] abgegeben wird. Dabei vollzieht sich der Übergang von $\text{MI}_{410} \rightarrow \text{MII}_{410}$ [128–130]. Bei der Transformation von MII_{410} nach N_{560} in einigen Millisekunden wird die Schiffische Base durch Asp96, das als interner Protonendonator fungiert [131–133], reprotoniert [106, 114, 115, 134–136]. Während des N_{560} -Intermediats wird ein Proton von der zytoplasmatischen Seite aufgenommen, damit der Protonendonator Asp96 wieder reprotoniert werden kann [137]. In Gegenwart der protonierten Aminosäure Asp96 und Asp85 isomerisiert das Retinal beim Übergang von N_{560} zu O_{640} thermisch von der 13-*cis* Konformation zurück in die ursprüngliche all-*trans* Konformation [138, 139]. Anschließend wird Asp85 durch die Reprotonierung von Glu204 wieder deprotoniert. Dieser Prozess beendet den Photozyklus und stellt den Ausgangszustand wieder her.

Modelle zum Photozyklus

Zur Beschreibung des Protonentransports existieren zwei Modelle: Das Local-Access-Modell und das IST-Modell. Im Folgenden werden beide Modelle näher erläutert: Im **Local-Access-Modell** [140–142] beginnt der Photozyklus nach Lichtanregung mit der Isomerisierung des Retinals von all-*trans* nach 13-*cis*. Die Isomerisierung verursacht eine lokale Änderung in der Nähe des aktiven Zentrums, so dass die Schiffische Base von der extrazellulären Seite sowie von der zytoplasmatischen Seite zugänglich wird [143]. Asp96 liegt im CP-Halbkanal protoniert vor und kann daher nicht als Protonenakzeptor fungieren, während Asp85 im EC-Halbkanal deprotoniert ist und damit als Protonenakzeptor dienen kann. Das Proton wird von der Schiffischen Base zum Asp85 in den EC-Halbkanal transferiert während der Bildung des MI-Intermediats. Im MI-Zustand befindet sich die Schiffische Base mit der Aminosäure Asp85 im Protonierungsgleichgewicht, während sie im MII-Zustand mit der Aminosäure Asp96 im CP-Halbkanal im Gleichgewicht vorliegt. Da MI und MII im Gleichgewicht vorliegen, steht die Schiffische Base während deren Besetzung alternierend mit der Aminosäure Asp85 und der Aminosäure Asp96 in Verbindung. Erst durch Abgabe des Protons an die EC-Seite erhöht sich der pK_a -Wert von Asp85 [120, 121] und somit steht Asp85 nicht mehr als Protonendonator für die Schiffische Base zur Verfügung. Ein weiterer Protonenaustausch mit der EC-Seite kann daher nicht erfolgen, so dass die Richtung des Protonentransports irreversibel festgelegt wird und die Unidirektionalität des Transports garantiert wird. Anschließend vollzieht sich eine Konformationsänderung im Protein [78, 144], der eine Verringerung des pK_a -Werts von Asp96 zur Folge hat. Dadurch werden Protonen von der zytoplasmatischen Seite aus zugänglich, so dass die Schiffische Base durch Asp96 wieder reprotoniert werden kann. Nach Protonierung der Schiffischen Base [53] erfolgt die thermische Isomerisierung des Retinals in die Ausgangskonformation all-*trans*. In diesem Modell stellen der Protonentransfer und das Schalten der Zugänglichkeit zwei voneinander abhängige Prozesse dar. Das Schalten ergibt sich direkt als Konsequenz aus dem Protonentransfer.

Im **IST-Modell** kann der Zyklus mit einer Abfolge von drei Schritten beschrieben werden [145, 146]. Die einzelnen Schritte umfassen folgende Prozesse: eine Isomerisierung (I), ein Schalten der Zugänglichkeit (Switch S) und einen Transfer eines Protons (T). Die Abfolge für den Zyklus von BR lautet: I*/T/S/T/I/S (Abb. 2.5). Der Photozyklus startet mit der lichtinduzierten Isomerisierung (I*) des Retinals von *all-trans* nach *13-cis*. Dabei ist die Schiffische Base nur vom EC-Halbkanal aus zugänglich. Anschließend wird ein Proton von der Schiffischen Base zum Protonenakzeptor Asp85 im EC-Halbkanal transportiert (T). Damit ändert sich der Protonierungsgrad der Schiffischen Base, die nun deprotoniert vorliegt. Anschließend wird die Zugänglichkeit der Schiffischen Base im Gleichgewichtszustand zwischen den beiden M-Intermediaten reguliert (S). Das MI-Intermediat, in dem die Schiffische Base nur vom EC-Halbkanal zugänglich ist, geht in das Intermediat MII über. In diesem Intermediat wird die Schiffische Base nun vom CP-Halbkanal aus zugänglich, so dass sie vom Protonendonator Asp96 wieder reprotoniert werden kann, wobei ein Proton transferiert wird (T). Nach der Reprotonierung der Schiffischen Base durch Asp96, isomerisiert das Retinal thermisch in seine Ausgangskonfiguration *all-trans* zurück (I). Solange die Schiffische Base noch deprotoniert vorliegt, kann das Retinal keine Rückisomerisierungsreaktion durchführen. Erst nach der thermischen Rückisomerisierung wird die Zugänglichkeit der Schiffischen Base wieder vom CP-Halbkanal zurück zum EC-Halbkanal geschaltet (S), der den Ausgangszustand im Photozyklus von BR wiederherstellt.

Die Isomerisierung des Retinals initiiert zwei Prozesse, den Transfer (T) und das Schalten (S), die miteinander konkurrieren. Dabei handelt es sich im Gegensatz zum Local-Access Modell um zwei voneinander *unabhängige* Prozesse. Die Reihenfolge der Prozesse (T) und (S) wird durch die relativen Ratenkonstanten bestimmt, die damit letztendlich auch die eindeutige Richtung des Transports festlegen.

Im IST-Modell werden keinerlei Annahmen über die strukturelle Natur des Schaltvorgangs gemacht. Einerseits könnte es größere strukturelle Änderungen wie Helixbewegungen [78, 147–152] oder ein Abknicken einer Helix [153, 154] beinhalten. Andererseits könnte das Schalten mit kleinen strukturellen Veränderungen verbunden sein, wie z. B. einer Rotation um eine Einfachbindung im Retinal (*13-cis*, *14-cis* nach *13-cis*, *14-trans* [155]), einer Reorganisation des Wasserstoffbrückennetzwerks im Proteinkanal oder einer Reorientierung des Stickstoffatoms an der Schiffischen Base von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite [156]. Ergebnisse in [84] deuten allerdings darauf hin, dass große Konformationsänderungen im Protein keine notwendige Bedingung für den Schaltprozess darstellen, sondern ihn möglicherweise nur unterstützen.

2.1.3 Primärreaktion des Photozyklus und Modelle

Dieser Abschnitt konzentriert sich auf die primären Schritte im Photozyklus von BR. Die lichtinduzierte Isomerisierung des Retinals im Femto- und Pikosekundenbe-

reich umfasst den angeregten Zustand I_{460} sowie das Intermediat J_{600} . Spätestens mit dem Intermediat K_{590} , das nach 3 bis 5 ps gebildet wird, ist die Isomerisierung abgeschlossen. Im Folgenden wird auf die Prozesse und Eigenschaften dieser Intermediate ausführlicher eingegangen. Welche Funktion die Intermediate I_{460} und J_{600} im Photozyklus übernehmen, konnte jedoch bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden und ist immer noch Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Ferner werden die drei wichtigsten Modelle für die Isomerisierungsreaktion des Retinals vorgestellt und beschrieben: Drei eindimensionale Modelle (Zwei-Zustandsmodell mit Überdämpfung, Drei-Zustandsmodell und Viel-Moden Modell) sowie ein zweidimensionales Modell (Zwei-Zustandsmodell mit Zwei-Moden).

Allgemeine Beschreibung der Primärreaktion

Der angeregte Zustand I_{460} Dieser Zustand kann u. a. über zwei verschiedene Prozesse, die Absorption aus dem angeregten Zustand (engl. excited state absorption, ESA) und die stimulierte Emission, beobachtet werden. Die ESA besitzt eine Bande im blauen Spektralbereich um 460 nm und eine weitere Bande um 750 nm [157, 158], während die stimulierte Emission im roten Spektralbereich bei Wellenlängen größer als 700 nm detektiert werden kann [103]. Bei transienten Absorptionsmessungen wird die stimulierte Emission jedoch im Wellenlängenbereich zwischen 600 nm und 800 nm teilweise durch die Bildung des Photoprodukts J_{600} und der ESA um 750 nm überlagert [159]. Somit kann die stimulierte Emission nur in der roten Flanke größer als 800 nm als isoliertes Signal spektroskopiert werden.

Eine optische Anregung mit einem Laserimpuls führt zu einer instantanen Populierung des angeregten Zustands und somit zum instantanen Einsetzen der stimulierten Emission. Allerdings gibt es auch Hinweise für ein verzögertes Auftreten der stimulierten Emission von etwa 30 fs [160–162], die hauptsächlich monoexponentiell innerhalb von 200 fs zerfällt. In Experimenten wird jedoch noch über eine zweite und längere Zeitkonstante von etwa 2 ps berichtet, die aber mit unter 10 % eine deutlich kleinere Amplitude aufweist [160, 163]. Höhere Amplituden im Bereich zwischen 20 % und 40 % hängen von den experimentellen Bedingungen ab [22, 159, 161, 162, 164, 165]. Diese längere Zeitkomponente wird inaktiven Retinalmolekülen zugeordnet, die keine Isomerisierungsreaktion durchführen können. Vergleicht man das zeitliche Verhalten von nativen und BR-Analogen, bei denen die $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung blockiert ist und damit die Isomerisierung unmöglich ist [160, 165–167], zeigt sich ein identisches Zeitverhalten bis 200 fs. Folglich liegt das Retinal im Zustand I_{460} noch in seiner all-*trans* Konfiguration [160, 168] bzw. in einer kaum verdrillten Konfiguration vor, ehe es weiter in den isomerisierenden Reaktionspfad gelangt [169].

Das Intermediat J_{600} und das Photoprodukt K_{590} Im Intermediat K_{590} liegt das Retinal schon eindeutig in der isomerisierten 13-*cis* Konfiguration vor [170]. Zum einen konnte dies durch Röntgenbeugungsexperimente bei 100 K [171] nachgewiesen werden, zum anderen durch zeitaufgelöste Ramanspektroskopie [99, 105, 172, 173],

die eine Erhöhung der HOOP-Moden (HOOP = engl. hydrogen out of plane) im Bereich zwischen 800 und 950 cm^{-1} feststellten. Als HOOP-Moden werden Schwingungen der Wasserstoffatome im Retinal bezeichnet, die sich orthogonal zur Polyenebene bewegen. Da das Retinal im Grundzustand *all-trans* eine nahezu planare Konformation einnimmt, verfügen die HOOP-Moden nur über eine geringe Intensität. Im K-Zustand gewinnen die HOOP-Moden aufgrund der Torsionsdeformationen in der Retinalkette deutlich an Intensität [99, 138, 174], da das Retinal durch die Isomerisierung von seiner planaren Geometrie in die verdrillte 13-*cis* Konformation übergeht [99, 170, 175, 176]. Bevor das Photoprodukt K_{590} im Zyklus erreicht wird, wird das Intermediat J_{600} mit einer Anklingszeit von 500 fs gebildet. Da mit Hilfe von stationären Strukturmethoden nur K_{590} als erstes Intermediat eingefangen und spektroskopiert werden konnte, handelt es sich bei J_{600} um einen heißen Schwingungszustand [177], der innerhalb von 3 ps in das Intermediat K_{590} relaxiert. Allerdings ist noch nicht eindeutig geklärt, in welcher genauen Struktur das Retinal im Intermediat J_{600} vorliegt. Einer Theorie zufolge ist in J_{600} die Isomerisierung des Retinals in seine 13-*cis* Konfiguration vollständig abgeschlossen [104, 178, 179]. Die andere Theorie besagt, dass das Retinal noch seine ursprüngliche *all-trans* Konfiguration besitzt. Eine *all-trans* Konfiguration des Retinals konnte in zeitaufgelösten kohärenten Antistokes Ramanexperimenten [172, 180] identifiziert werden, deren Zeitauflösung jedoch nicht ausreicht, um diesen Prozess mit 500 fs zu charakterisieren. Ebenso deutet der Vergleich von nativen und BR-Analogen in transienten Absorptionsmessungen [160] auf Grund des identischen Zeitverhaltens bis zu einigen hundert Femtosekunden eher auf eine *all-trans* Konfiguration hin. Doig et al. interpretieren aus experimentellen Ergebnissen [105] die Umwandlung von J_{600} nach K_{590} als ein Schwingungskühlen des Chromophors, das zusätzlich mit einer Konformationsrelaxation des Retinals verbunden ist [103, 104, 181, 182]. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass das Retinal im Intermediat J_{600} eine stark verdrillte Form annimmt und diese verspannte 13-*cis* Konformation erst mit dem Übergang in das Intermediat K_{590} in seinen Grundzustand relaxiert.

Modelle zur Beschreibung der Primärreaktion von Bakteriorhodopsin

Die Primärreaktion umfasst die Isomerisierung des Retinals, die durch eine Torsionsbewegung um die zentrale $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung charakterisiert ist. Die dazugehörige Reaktionskoordinate beinhaltet die Isomerisationskoordinate sowie die Torsionskoordinate. Der folgende Abschnitt stellt ein- und mehrdimensionale Modelle zur schematischen Erklärung der Isomerisierungsreaktion vor. In diesen Modellen wird die Reaktion als Trajektorie in einem Potentialenergieschema beschrieben. Die Energie wird als Funktion von einer oder mehreren molekularen Koordinaten dargestellt.

Zwei-Zustandsmodell In diesem Modell erfolgt die Reaktion in einer Dimension unter Verwendung der Isomerisierungskoordinate als Reaktionskoordinate [103, 181] (Abb. 2.6). Nach lichtinduzierter Anregung gelangt das Retinal aus seiner *all-trans*

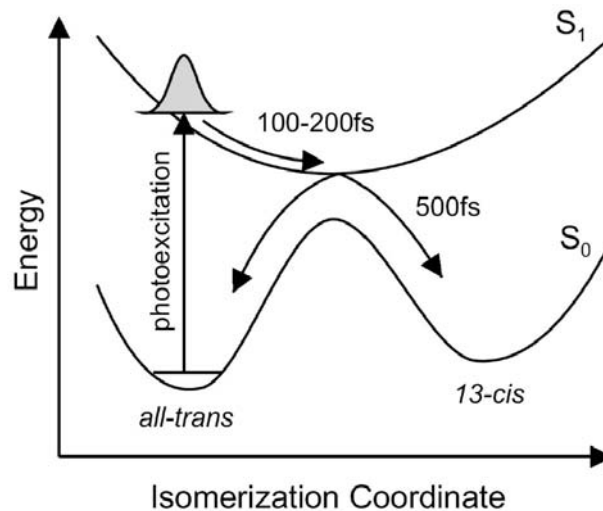


Abbildung 2.6: Das Zwei-Zustandsmodell mit Überdämpfung [181]. Nach lichtinduzierter Anregung bewegt sich das Wellenpaket repulsiv auf der angeregten Potentialfläche S_1 barrierelos in das Minimum, aus dem es mit 500 fs in den Grundzustand S_0 *all-trans* oder *13-cis* übergeht.

Konfiguration in den Franck-Condon Bereich (FC-Bereich) des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 . Die Potentialfläche wird entlang der Isomerisierungscoordinate als repulsiv angenommen und das Wellenpaket bewegt sich ballistisch entlang dieser Coordinate. Es bewegt sich innerhalb von 200 fs zum Potentialminimum, während das Retinal in eine leicht verdrehte Konformation übergeht. Entlang der Coordinate erhöht sich die Energie des elektronischen Grundzustandes und die Potentialflächen der beiden Zustände nähern sich an. Dabei geht ein Teil der Moleküle zurück in den Ausgangszustand *all-trans*. Der andere Teil wählt den Produktpfad und reagiert innerhalb von 500 fs zum *13-cis* Photoprodukt. Für das stark repulsive Potential sollte die Fluoreszenz bzw. die stimulierte Emission um 100 bis 200 fs verzögert auftreten und sich während der Reaktion rasch zu niedrigeren Energien verschieben. Dies steht allerdings im Widerspruch zu bisherigen zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen [103, 164], in denen kein Stokes-shift von dieser Größenordnung beobachtet werden konnte, sowie zu zeitaufgelösten Emissionsspektren [160], die eine Verschiebung nur innerhalb der ersten 30 fs erfahren.

Drei-Zustandsmodell Anfinrud et al. entwickelten aus theoretischen und experimentellen Ergebnissen ein weiteres eindimensionales Modell, das sogenannte Drei-Zustandsmodell [143, 159, 161, 183]. Das Modell berücksichtigt im Gegensatz zum Zwei-Zustandsmodell drei elektronische Zustände (Abb. 2.7). Durch die Wechselwirkung des ersten und des zweiten angeregten Zustandes entsteht eine Barriere im ersten angeregten Zustand. Dieses Modell wird durch das instantane Auftreten der

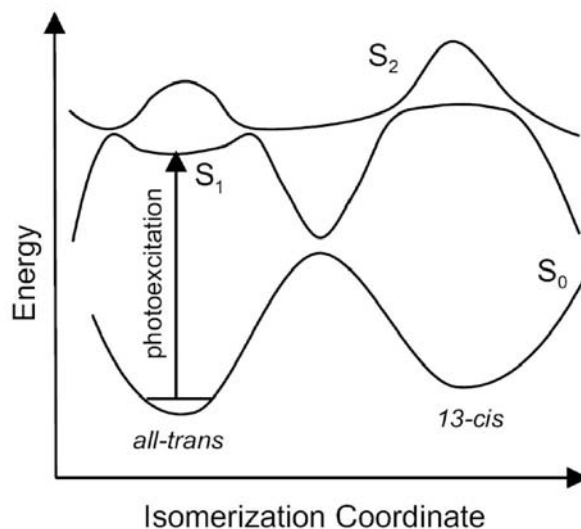


Abbildung 2.7: Drei-Zustandsmodell zur Beschreibung der Primärreaktion [161]. In diesem Modell existiert eine Barriere im angeregten Zustand, die durch die Wechselwirkung des ersten und des zweiten angeregten Zustandes zustandekommt.

stimulierten Emission und dem Vorhandensein einer weiteren ESA-Bande um 770 nm [157] begründet. Nach dem Zwei-Zustandsmodell sollte die Fluoreszenzlebensdauer < 0.5 ps und temperaturunabhängig sein. Dies widerspricht frühen experimentellen Ergebnissen aus [184, 185], die eine Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer beobachteten¹. Die Lebensdauer verlängert sich von 0.5 ps bis zu 60 ps, wenn die Temperatur von Raumtemperatur auf 77 K abgekühlt wird. Dieser Trend wäre eher mit der Existenz einer Barriere von 4 bis 7 kJ/mol erklärbar. Außerdem sollten die stimulierten Emissionsspektren eine Verschiebung zu niedrigeren Energien erfahren, wenn sich das Retinal entlang der Isomerisierungscoordinate bewegt. Die stimulierten Emissionsspektren weisen eine Anklingzeit von weniger als 30 fs auf [189], die spektrale Form der stimulierten Emission aber verändert sich bis zu 1 ps kaum [161]. Dies legt nahe, dass die Anregung von BR in eine relativ flache Region der angeregten Potentialfläche erfolgt und nicht in eine repulsive Region. Während der Emission sollte das Retinal folglich eher in einer *all-trans* als in einer *13-cis* Konfiguration vorliegen. Damit sollte die Isomerisierungsreaktion nicht von der Proteinstruktur, sondern von einer intrinsischen Eigenschaft des Retinals bestimmt werden.

Im Drei-Zustandsmodell wird die Existenz einer kleinen Barriere postuliert, die die FC aktive Region von der steil verlaufenden Region entlang der Isomerisierungscoordinate trennt. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes ist näherungsweise durch die Zeit bestimmt, die zum Überwinden der Barriere benötigt wird. Die verdrillte Konformation korreliert mit dem Übergang zur Isomerisierung. Von dort führt der

¹Die Ergebnisse beruhen auf älteren Daten, die durch neuere Experimente [186–188] widerlegt worden sind. Intaktes BR zeigt keine Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer.

Reaktionspfad in einen heißen Grundzustand zurück, indem das Retinal entweder in den Ausgangszustand *all-trans* oder mit 0.2 ps in das Photoprodukt *13-cis* übergeht. Allerdings kann in diesem Modell die existierende Zeitkonstante von 0.5 ps in keiner Weise beschrieben werden. Auch wird das instantane Auftreten der langwelligen stimulierten Emission nicht berücksichtigt.

Rein eindimensionale Modelle, das Zwei-Zustandsmodell mit Überdämpfung und das Drei-Zustandsmodell, sind nicht in der Lage, die Primärreaktion von BR ohne Widersprüche zu beschreiben, und stellen jeweils eine zu stark vereinfachte Näherung des eigentlich mehrdimensionalen Potentials dar.

Viel-Moden Modell Ein weiteres Modell stellt das Viel-Moden Modell dar (Abb. 2.8) [190]. In diesem Modell werden für die Beschreibung der Primärreaktion zusätzlich zur niederfrequenten Torsionskoordinate mehrere hochfrequente Moden berücksichtigt, entlang derer die Reaktion abläuft. Nach einer optischen Anregung mit einem Laserimpuls entwickelt sich das System sukzessive entlang der verschiedenen Schwingungskordinaten. Zunächst wird die hochfrequente C-C-Streckschwingung angeregt, die mit einer Zeitkonstante von 200 fs relaxiert. Daran schließt sich die Relaxation der niederfrequenten HOOP-Moden mit 500 fs an, bevor die Isomerisierung über eine Torsionsbewegung eingeleitet wird. Mit dem Erreichen des K-Zustandes ist die Isomerisierungsreaktion nach etwa 3.5 ps abgeschlossen. Die Reaktionspfade, entlang derer sich die Schwingungsrelaxation der Streckschwingungskordinate mit 200 fs und der HOOP-Moden mit 500 fs vollzieht, führen zu den Intermediaten I_{460} und J_{600} im elektronisch angeregten Zustand.

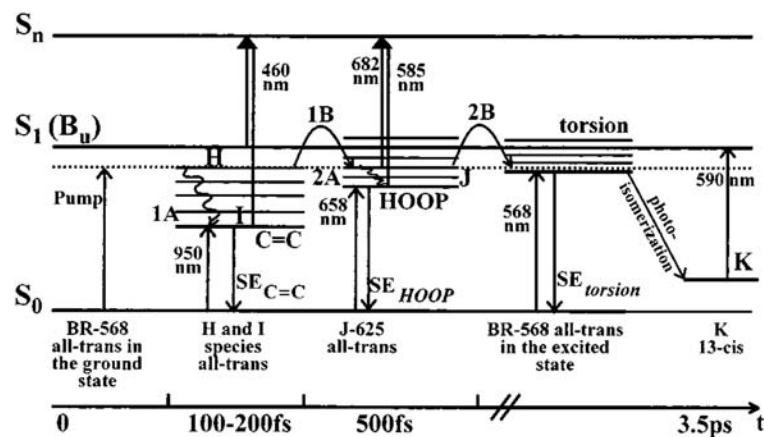


Abbildung 2.8: Viel-Moden Modell zur Beschreibung der Primärreaktion [190]. Die Reaktion läuft entlang niederfrequenter und hochfrequenter Moden ab.

Zwei-Zustandsmodell mit Zwei-Moden Um eine Verbesserung der theoretischen Beschreibung zu erreichen, wird das Modell mit Hilfe von mehrdimensionalen Poten-

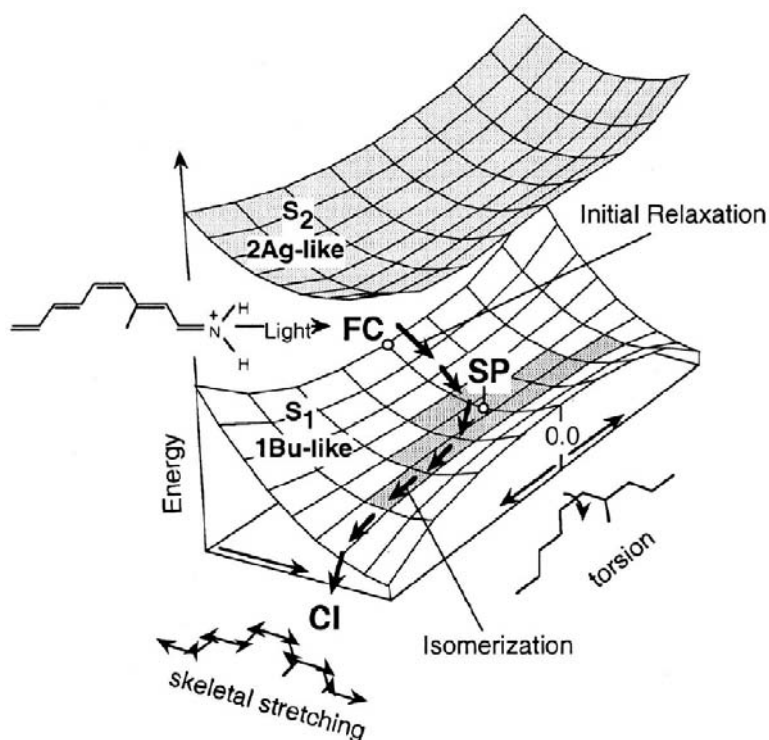


Abbildung 2.9: Zweidimensionales Modell zur Beschreibung der Primärreaktion. BR relaxiert aus dem FC-Bereich in das Potentialminimum (SP) und gelangt von dort zur konischen Durchschneidung (CI) (Abbildung aus [191]).

tialflächen dargestellt. Dabei ergibt sich keine Aufspaltung der S_0 - und S_1 -Potentialflächen wie im eindimensionalen Modell, sondern eine Art Reaktionstrichter, eine sogenannte konische Durchschneidung (engl. conical intersection, CI) [192, 193]. Sie verbindet die beiden Potentialflächen miteinander und ermöglicht einen sehr schnellen strahlungslosen Übergang von der S_1 - zur S_0 -Potentialfläche. Dieses Modell wurde durch quantenchemische ab-initio Simulationen an retinalähnlichen Molekülen, protonierten Schiffchen Basen, sowie gelockten Retinal bzw. Polyenen, gestützt, das die Reaktionen auf der ersten angeregten Potentialfläche widerspiegelt [191, 194–196]. Abb. 2.9 zeigt die erste angeregte Potentialfläche in Abhängigkeit von zwei Moden, der Streckschwingungskordinate des Gerüsts und der Torsionskoordinate. Es erfolgt eine lichtinduzierte Anregung in den FC-Bereich des ersten angeregten Zustandes, in dem ein Wellenpaket generiert wird, das entlang der Potentialfläche auf einem barrierelosen Reaktionspfad relaxiert. Die Bewegung aus dem FC-Bereich wird rein von der totalsymmetrischen Streckschwingungskordinate dominiert [197], die das zunächst planare Molekül mit einer Kombination aus einer Dehnung der zentralen Doppelbindung und einer Stauchung der Einfachbindung aus dem FC-Bereich treibt. Nach dieser Relaxationsbewegung innerhalb von 100 bis 200 fs gelangt das Molekül in ein stationäres Energieplateau um den Sattelpunkt (SP), der das Auseinanderfließen des

Wellenpakets verhindert. Der flache Bereich um SP wird dem intermediären Zustand I₄₆₀ [194] zugeordnet. Im SP ist die zentral relevante Doppelbindung gedehnt, aus dem sich eine weitere Relaxation entlang einer schwach gekoppelten asymmetrischen Torsionskoordinate vollzieht, die die Torsion um die zentrale C₁₃=C₁₄-Bindung erlaubt. Die Entwicklung findet entlang der Torsionskoordinate zur CI statt, in der das Retinal eine um 90° verdrillte Doppelbindung aufweist. Von der CI findet ein sehr effizienter Zerfall in den Grundzustand statt, der von der Bildung der Retinalisomere begleitet wird.

Dieses Modell scheint im Vergleich zu den eindimensionalen Modellen alle charakteristischen Eigenschaften der Fluoreszenz zu beinhalten und gibt damit eine realistischere Beschreibung der Primärreaktion wieder.

2.2 Halorhodopsin

2.2.1 Struktur

Im Archaeon befinden sich unter optimalen Bedingungen 300 000 Kopien von BR pro Zelle. Im Gegensatz dazu ist HR nur in einem deutlich geringeren Maße von 15 000 bis 30 000 Kopien vertreten. Weitere allgemeine Informationen können den folgenden Übersichtsartikeln entnommen werden: [39, 198–202].

HR fungiert als lichtgetriebene Anionenpumpe, die Chloridionen daneben Bromid-, Iodid- sowie Nitrationen in das Innere der Zelle transportiert [41, 42, 203–209]. HR dient zur Aufnahme von Salz, um den osmotischen Ausgleich während des Zellwachstums zu gewährleisten. In der Zellmembran bildet HR im Gegensatz zu BR keine zweidimensionalen Kristalle, sondern kristalline Strukturen in Form von alternierenden Tetrameren aus. Die Primärsequenz von HR setzt sich aus 274 Aminosäuren zusammen und erreicht damit ein etwas größeres Molekulargewicht von 27 kD als BR [211]. Analog zu BR faltet sich das Protein zu sieben α -Helices (Abb. 2.10), die einen äußeren Ring und einen inneren Ring bilden, wobei der innere Ring einen hydrophilen Transportkanal definiert [212–217]. Der innere Ring umgibt den Retinalchromophor, der über eine protonierte Schiffische Base mit der ϵ -Aminogruppe des Lys242 in der Helix G gebunden ist. Das Retinal ist im Zentrum des Kanals platziert und trennt dadurch den CP-Halbkanal vom EC-Halbkanal. In HR verfügt der CP-Halbkanal über einen etwas größeren Querschnitt von 137 Å² als in BR (106 Å²) [218], der damit größer ist als es für einen Chloridtransport erforderlich wäre.

HR und BR weisen sehr große strukturelle Ähnlichkeiten auf. Dabei nimmt das Maß der homologen Struktur in der Reihenfolge vom aktiven Zentrum über die Transmembranregion bis zu den verbindenden Schleifen hin ab. In der Transmembranregion sind 36 % aller Aminosäuren von BR identisch, während in den verbindenden Schleifen an der Proteinober- und -unterseite nur noch 19 % identisch sind [64, 65, 211]. Die größten strukturellen Übereinstimmungen lassen sich in der Bindungstasche des Retinals beobachten [81], da das Retinal ebenfalls in einer *all-trans* Konfiguration

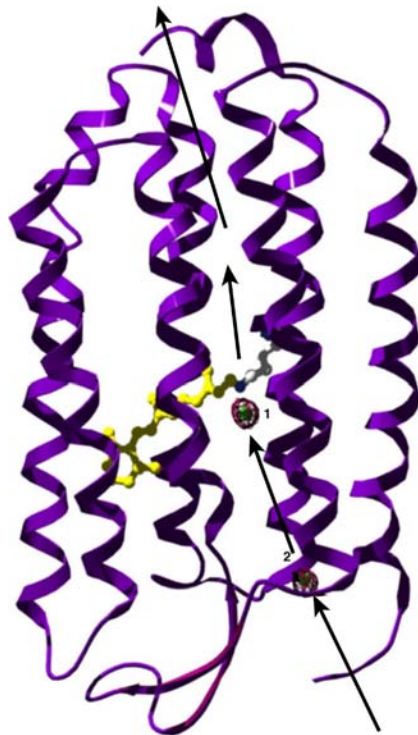


Abbildung 2.10: Dreidimensionale Struktur von HR mit Retinalchromophor und den beiden Chloridbindungsstellen 1 und 2. Die Pfeile kennzeichnen die Richtung des Chloridtransports. Abbildung aus [210].

vorliegt und über eine Schiffsche Base an das Protein gebunden ist. Daher sollte die Bindungstasche von HR sehr ähnlich zu der von BR sein [173]. In der näheren Umgebung des Retinals befinden sich insgesamt 21 Aminosäuren, von denen 13 Aminosäuren auch in BR vorhanden sind. Die verbleibenden 8 Aminosäuren weisen zum Teil eine ähnliche Struktur zu korrespondierenden Aminosäuren in BR auf. Ein wesentlicher struktureller Unterschied betrifft den Protonenakzeptor Asp85 und den Protonendonator Asp96 in BR, der eine enorme Auswirkung auf die biologische Funktion des Proteins hat. Das Asp96 von BR ist in HR durch die Aminosäure Alanin und das Asp85 von BR durch die hydrophile neutrale Seitenkette Thr111 ersetzt. Vergleicht man alle bis heute sequenzierten Rhodopsine, enthalten alle Chloridionenpumpen die charakteristischen Aminosäuren Thr und Ala, während Protonenpumpen als entsprechende Aminosäuren zwei Aspartate besitzen [30].

In HR kann ein Chloridion in der Nähe der Schiffschen Base gebunden werden (Abb. 2.11) [219–221]. Die Schiffsche Base ist über Wasserstoffbrückenbindungen schwach an die negativen Gegenladungen, bestehend aus den Aminosäuren Asp238, Thr111, Arg108 und dem Chloridion, gekoppelt [222]. Dabei imitiert das Chloridion die Carboxylgruppe des Asp85 in BR. In HR existieren zwei Bindungsstellen, die mit 1 und 2 bezeichnet werden [223, 224]. Ionen, die an die Bindungsstelle 2 gebunden werden,

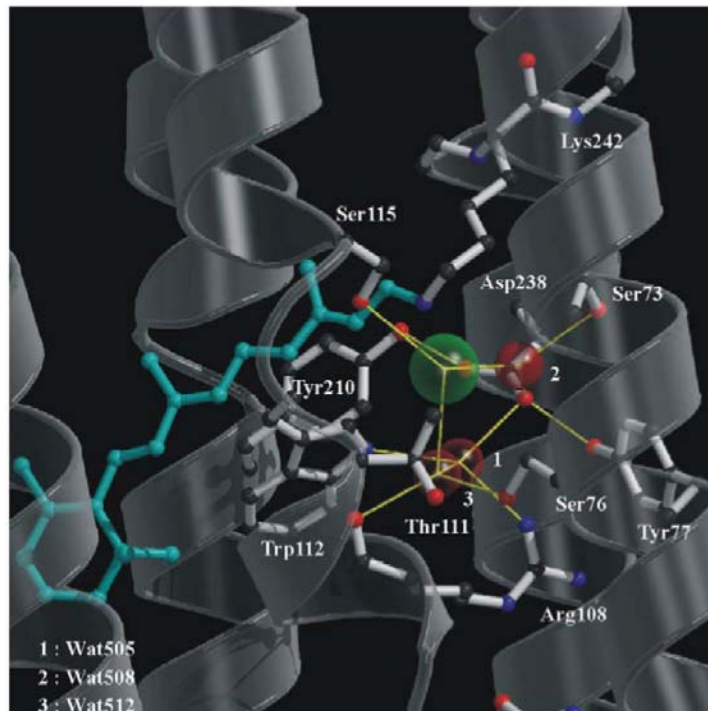


Abbildung 2.11: Die Chlorid-Bindungsstelle in HR (Abbildung aus [216]), wobei Wassermoleküle (rot), das Chloridion (grün) und das Retinal (türkis) eingezeichnet sind.

können nicht transportiert werden [225]. Allerdings beeinflusst die Anionenbindung an die nichtspezifische Bindungsstelle 2 den pK_a -Wert der Schiffsbasis im Retinal. Man geht davon aus, dass sich die Bindungsstelle 2 räumlich in der Nähe von der spezifischen Bindungsstelle 1 im EC-Kanal befindet. Um einen Anionentransport auszulösen, muss die spezifische Bindungsstelle 1 besetzt werden. In der Transmembranregion lassen sich nur drei positiv geladene Aminosäuren identifizieren, die als Anionenbindungsstelle in Frage kommen: Arg108, Arg200 und die protonierte Schiffsbasis. In Analogie zu BR mit seinen beiden Bindungsstellen Asp85 und Asp96 verfügt HR über zwei Argininreste: Arg108 im EC-Kanal und Arg200 im CP-Kanal. Auf beiden Seiten sind zwei Threoninreste, das Thr111 auf der EC-Seite und das Thr203 auf der CP-Seite, lokalisiert. Das Aminosäurepaar Thr111-Arg108 dient als Chloridbindungsstelle [225], wobei Arg108 an der Bindungsstelle 1 in der Nähe der Schiffsbasis beteiligt ist [226].

Um bei BR einen aktiven Protonentransport auszulösen, muss BR vorher lichtadaptiert werden, um zu 100 % eine all-*trans* Konfiguration herzustellen. Im Gegensatz dazu kann eine Lichtadaptation von HR keine all-*trans* Konfiguration zu 100 % erzielen, so dass stets eine Verteilung von Retinalisomeren vorliegt [227–229]. Zudem erzeugt eine kontinuierliche Belichtung den Zwischenzustand HR_{L410} mit deprotonierter Schiffsbasis und ruft eine Akkumulation dieses Zustandes hervor. Dieser

Prozess inaktiviert HR als Chloridpumpe, so dass HR die Fähigkeit verliert, Ionen zu transportieren [203, 230].

2.2.2 Photozyklus

HR führt analog zu BR nach lichtinduzierter Anregung einen Photozyklus durch, der nach 14 ms abgeschlossen ist [231]. Es existieren zwei verschiedene Photozyklen, die von der umgebenden Salzkonzentration abhängen [232]. Im Folgenden soll nur der aktive Photozyklus mit Chloridtransport beschrieben werden (Abb. 2.12), der bei hohen Salzkonzentrationen auftritt [41].

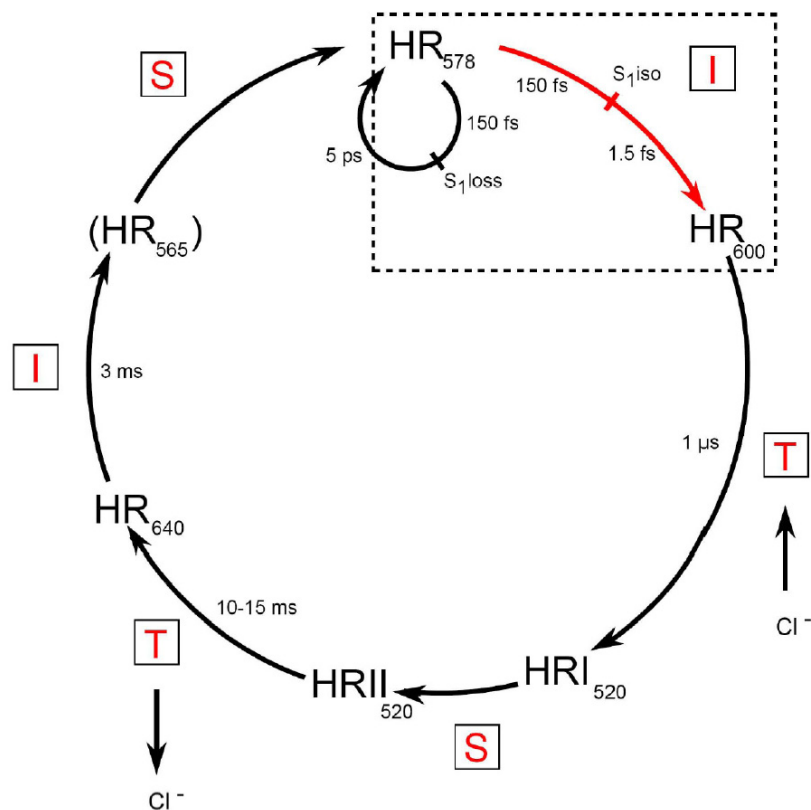


Abbildung 2.12: Photozyklus von HR. Die Indizes der Intermediate bezeichnen jeweils die Wellenlänge ihres Absorptionsmaximums. Arg108/Thr111 und Arg200/Thr203 stellen beide wichtige Aminosäurepaare dar, die wesentlich am Chloridtransport beteiligt sind. Die drei Buchstaben I, S und T bezeichnen die formalen Prozesse im IST-Modell. Die gestrichelte Umrandung kennzeichnet die Primärreaktion im Femto- und Pikosekundenbereich.

Allgemeine Beschreibung des Photozyklus

Nach Initiierung des Photozyklus relaxiert der angeregte elektronische Zustand und erfährt eine Aufteilung in einen nichtreaktiven Pfad, der wieder in den Grundzustand zurückführt, und in einen reaktiven Pfad mit einer deutlich geringeren Quantenausbeute von ca. 0.3 als BR [203, 233]. Im reaktiven Pfad erfolgt eine Isomerisierung des Retinals von *all-trans* nach *13-cis* [219, 234–237]. Diese initiale Isomerisierung wird durch die Bildung eines rotverschobenen Intermediats (**HR**₆₀₀, **HR**_K) mit einem Absorptionsmaximum bei 600 nm eingeleitet und ist nach etwa 2 ps abgeschlossen [238]. Das Photoprodukt **HR**₆₀₀ weist eine Ähnlichkeit zum K-Intermediat von BR auf [239] und bleibt für mindestens 2 ns stabil [240, 241]. Das **HR**₆₀₀-Intermediat zerfällt in mehreren Mikrosekunden und geht in das Intermediat **HR**_{520I} bzw. in das LI-Intermediat über. Während dieses Prozesses erfolgt eine schnelle Relaxation im Protein. Dabei nimmt der pK_a-Wert der Schiffischen Base von einem Wert zwischen 7.4 und 9.6 [203] abhängig vom anwesenden Anion [223, 242] auf 4.8 ab. Das Chloridion besetzt die Bindungsstelle 1, die aus dem Aminosäurepaar Arg108 und Thr111 gebildet wird. Die Absenkung des pK_a-Werts der Schiffischen Base verändert die Wechselwirkung mit dem Chloridion [243], die während der Lebensdauer von **HR**_{520I} an eine Lageveränderung des Chloridions gekoppelt ist. Das Chloridion wird zur Schiffischen Base in seiner *13-cis* Konfiguration transportiert [122, 219, 226]. Analog zu den beiden M-Intermediaten in BR existieren in HR ebenfalls zwei Intermediate [202] **HR**₅₂₀(EC) und **HR**₅₂₀(CP) bzw. LI und LII. Zwischen diesen beiden Intermediaten wird die Zugänglichkeit der Schiffischen Base vom EC-Halbkanal zum CP-Halbkanal geschaltet, um die Unidirektionalität des Ionentransports zu gewährleisten. Während des Schaltvorgangs vollzieht sich eine Konformationsänderung, die eine Verbindung von der Schiffischen Base zum gebundenen Chloridion und dem Zytoplasma herstellt. Dadurch wird eine Abgabe des Chloridions in das Zytoplasma möglich. Das Chloridion wird von der Schiffischen Base über das Aminosäurepaar Thr203 und Arg200 zur zytoplasmatischen Oberfläche transportiert. Während dieses Vorgangs zerfällt das Intermediat **HR**₅₂₀(CP)/ LII-Intermediat im Millisekundenbereich, auf das die Bildung des Intermediats **HR**₆₄₀ bzw. des O-Intermediats folgt. Der Chloridtransfer ist mit einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um insgesamt 120 nm (von 520 nm nach 640 nm) verbunden. Die beiden Intermediate **HR**₅₂₀ und **HR**₆₄₀ liegen in einem Gemisch vor, so dass es zu einer Superposition der Spektren kommt. Das Verhältnis von beiden Intermediaten hängt von der umgebenden Chloridkonzentration ab [231], die bestimmt, welches der Intermediate hauptsächlich beobachtet wird. Im Intermediat **HR**₆₄₀ liegt die protonierte Schiffische Base noch in der *13-cis* Konfiguration vor [219, 237]. Wenn das Intermediat **HR**₆₄₀ zerfällt, isomerisiert das Retinal thermisch zurück in seine Ausgangskonfiguration *all-trans*. Außerdem wird mit der Entstehung des Intermediats **HR**₅₆₅ die Zugänglichkeit der Schiffischen Base vom CP-Halbkanal zurück zum EC-Halbkanal geschaltet. Die direkte Umwandlung in den Grundzustand **HR**₅₇₈ erfordert zusätzlich die Aufnahme eines Chloridions [222] an die nun unbesetzte Bindungsstelle 1 [231], ehe der Aus-

gangszustand von HR nach einigen Millisekunden wieder erreicht wird.

Die Photozyklen von BR und HR unterscheiden sich im Protonierungsgrad der Schiffischen Base. Bei BR besitzt die Schiffische Base als aktives Zentrum ein Proton. Im Gegensatz dazu ist bei HR das aktive Zentrum am Anfang nicht durch ein Chloridion besetzt. Daher erfolgt bei HR zunächst der Ionentransfer *zum* aktiven Zentrum im Gegensatz zu BR, bei dem das Proton *weg* vom aktiven Zentrum transportiert wird. Die Pumprichtung in HR verläuft damit entgegengesetzt zu BR.

Der Photozyklus von HR lässt sich im IST-Modell als Abfolge von drei Schritten beschreiben. Die Abfolge setzt sich aus verschiedenen Prozessen zusammen, einer Isomerisierung (I), einem Ionentransport (T) und einem Schalten der Zugänglichkeit (S). HR weist die gleiche Abfolge wie BR auf: I*/T/S/T/I/S (Abb. 2.12). Eine lichtinduzierte Anregung löst die Isomerisierungsreaktion des Retinals von all-*trans* nach 13-*cis* aus (I*). Anschließend wird das Chloridion von der Bindungsstelle 1 zur Schiffischen Base transportiert (T). Um die Unidirektionalität des Chloridtransports zu gewährleisten, muss die Zugänglichkeit der Schiffischen Base von der EC-Seite zur CP-Seite geschaltet werden (S). Dieser Vorgang ereignet sich während der Umwandlung des Intermediats HR_{520I}(EC) in das Intermediat HR_{520I}(CP), wodurch die Abgabe des Chloridions an das Zytoplasma ermöglicht wird (T). Anschließend isomerisiert das Retinal thermisch zurück in seine all-*trans* Konfiguration (I) und die Zugänglichkeit der Schiffischen Base wird vom CP-Halbkanal wieder zum EC-Halbkanal geschaltet (S), ehe der ursprüngliche Ausgangszustand wiederhergestellt wird.

2.2.3 Modelle zur Beschreibung der Primärreaktion

Im Folgenden wird genauer auf die Primärreaktion im Femto- und Pikosekundenbereich eingegangen. Dabei werden Modellansätze zur Beschreibung der Primärreaktion vorgestellt. Es haben sich drei verschiedene Modelle für die Primärreaktion etabliert, die von den folgenden Gruppen Polland et al., Kandori et al. und Arlt et al. aufgestellt wurden.

Modell von Polland et al. Polland et al. konnten durch die Kombination von zeitaufgelöster Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie für den angeregten Zustand von HR eine Lebensdauer von 5 ps bestimmen. Zur Beschreibung der Primärreaktion werden zwei Modelle vorgeschlagen [240].

Im ersten Modell (Abb. 2.13 a)) gelangt HR nach lichtinduzierter Anregung aus dem Grundzustand in den elektronisch angeregten Zustand S₁. Dort kommt es zu einer Verzweigung mit zwei parallelen Zerfallsprozessen: die Bevölkung des Grundzustands S₀ von HR und gleichzeitig die Bildung des Photoprodukts HR_K. Beide Prozesse laufen jeweils mit 5 ps ab. Da in ihren Experimenten nur eine Zeitauflösung von 4.5 ps erzielt wurde, war es nicht möglich zu entscheiden, ob das Photoprodukt HR_K eventuell schneller als mit 5 ps entsteht. Daher schlagen Polland et al. ein weite-

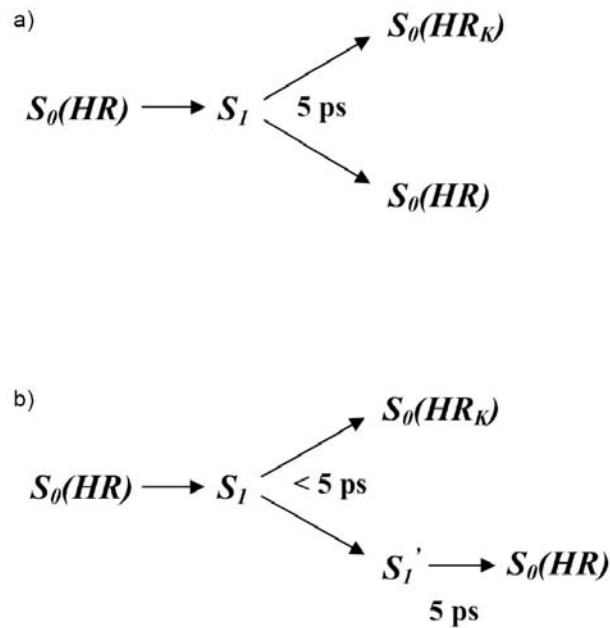


Abbildung 2.13: Zwei Modelle zur Beschreibung der Primärreaktion von HR nach Poland et al. Im Modell a) erfolgt nach der Anregung aus dem Grundzustand $S_0(HR)$ eine Verzweigung im angeregten Zustand S_1 , deren Prozesse parallel jeweils mit 5 ps zerfallen. Das Modell b) basiert auf der Annahme, dass der Produktzustand $S_0(HR_K)$ mit weniger als 5 ps gebildet wird. Nach der Anregung kommt es zu einer Verzweigung im S_1 . Der Produktzustand entsteht direkt aus dem S_1 mit weniger als 5 ps. Der initiale Grundzustand $S_0(HR)$ wird über einen Zwischenzustand S_1' im angeregten Zustand erreicht.

res modifiziertes Modell (unteres Modell in Abb. 2.13 b)) mit der Annahme vor, dass das Photoprodukt HR_K mit einer kürzeren Zeitkonstante als 5 ps entsteht. Es wird ein weiterer angeregter Zustand S_1' eingeführt, der durch die Lebensdauer von 5 ps charakterisiert ist, sich aber optisch vom angeregten Zustand S_1 durch seine elektronische oder konformationelle Struktur unterscheidet. Nach lichtinduzierter Anregung wird der angeregte Zustand S_1 bevölkert, in dem eine instantane Verzweigung erfolgt. Auf der S_1 -Potentialfläche wird im reaktiven Produktpfad das Photoprodukt HR_K gebildet. Parallel dazu entsteht im anderen Pfad zunächst der langlebige angeregte Zustand S_1' , bevor dieser mit 5 ps zerfällt und in den Grundzustand S_0 von HR relaxiert.

Ausgehend von den experimentellen Ergebnissen konnte keine Aussage getroffen werden, welches von beiden Modellen die Primärreaktion adäquater beschreiben kann.

Modell von Kandori et al. Ein weiteres Modell zur Beschreibung des primären Reaktionsmechanismus schlagen Kandori et al. vor (Abb. 2.14) [233, 244, 245]. In ihren Experimenten erreichten sie mit 0.6 ps eine deutlich höhere Zeitaufösung als Poland

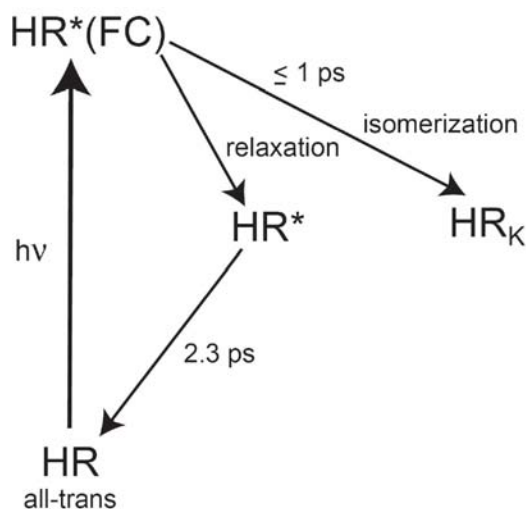


Abbildung 2.14: Das Modell nach Kandori et al.: Nach einer lichtinduzierten Anregung aus dem Grundzustand $\text{HR}_{\text{all-trans}}$ wird der FC-Bereich des angeregten Zustandes $\text{HR}^*(\text{FC})$ bevölkert. Dort findet eine Verzweigung statt. Dabei relaxiert ein Teil in den Zwischenzustand HR^* , aus dem die Rekombination des Grundzustandes $\text{HR}_{\text{all-trans}}$ innerhalb von 2.3 ps stattfindet. Gleichzeitig führt ein Teil in weniger als 1 ps eine Isomerisierungsreaktion durch und bildet den HR_K -Zustand.

et al. Die Moleküle gelangen durch eine lichtinduzierte Anregung in den FC-Bereich des ersten elektronisch angeregten Zustandes $\text{HR}^*(\text{FC})$. Im FC-Bereich laufen zwei Prozesse simultan ab und konkurrieren miteinander. Im ersten Prozess entsteht entlang der $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ -Isomerisierungscoordinate in weniger als 1 ps der Produktzustand HR_K . Im zweiten Prozess relaxiert ein Teil der Moleküle in einen Zwischenzustand HR^* entlang einer Reaktionscoordinate, die sich von der Isomerisierungscoordinate unterscheidet. Aus dem Zwischenzustand HR^* kehren die Moleküle über einen strahlenden oder nichtstrahlenden Prozess mit 2.3 ps wieder in den Grundzustand *all-trans* zurück.

Das Schema von Kandori weist eine große Ähnlichkeit mit dem erweiterten Schema von Polland auf, nur die Zeitkonstanten unterscheiden sich um den Faktor zwei. Ein weiteres Modellschema, das von Kobayashi stammt, ist mit dem von Kandori identisch [246].

Modell von Arlt et al. Arlt et al. führten transiente Absorptionsmessungen mit einer noch höheren Zeitaufösung von etwa 150 fs durch [247, 248], in denen sie drei Zeitkonstanten beobachteten: 170 fs, 1.5 ps und 8.5 ps. In ihrem Modell (Abb. 2.15) wird nach einer lichtinduzierten Anregung der FC-Bereich im S_1 bevölkert, dessen Population mit 170 fs biphasisch in zwei relaxierte Zustände auf der S_1 -Potentialfläche zerfällt. Einer der beiden relaxierten Zustände HR^*_1 mündet entlang einer Isomerisierungscoordinate in einen reaktiven Pfad und bildet das Photoprodukt HR_{600} .

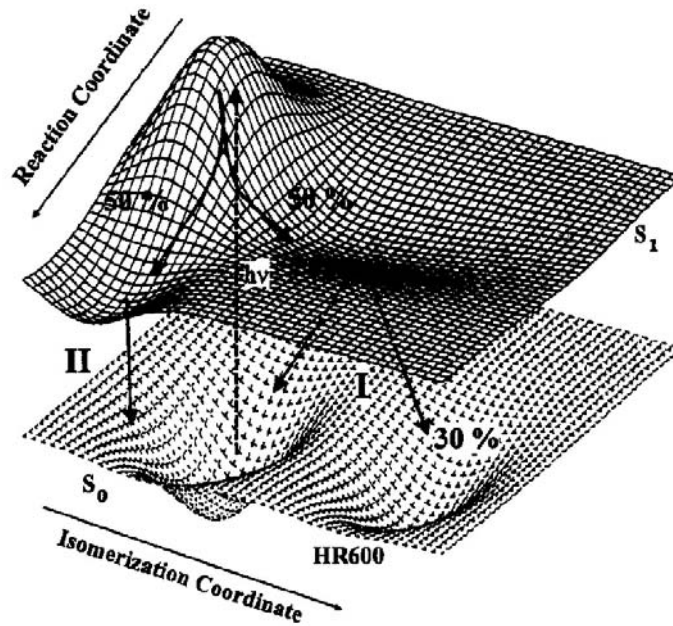


Abbildung 2.15: Potentialschema nach Arlt et al. für die Primärreaktion von HR [247]. Nach einer lichtinduzierten Anregung von HR erfolgt eine biphasische Verzweigung auf der S_1 -Potentialfläche, wobei ein Teil über einen reaktiven Kanal das isomerisierte Photoprodukt HR_{600} bildet und ein Teil zurück in den Grundzustand *all-trans* zerfällt.

Der andere relaxierte Zustand HR^*_{II} bewegt sich entlang einer allgemeinen Reaktionskoordinate und kehrt in den Grundzustand *all-trans* zurück. Eine Zuordnung konnte jedoch nicht getroffen werden, mit welcher der beiden Zeitkonstanten (1.5 ps oder 8.5 ps) das Photoprodukt HR_{600} entsteht. Als Ursache für die beiden Reaktionskanäle im S_1 -Zustand kommt eine Heterogenität des Grundzustandes (*all-trans*, *13-cis*) in Frage. Durch neue zeitaufgelöste Infrarotexperimente im Femtosekundenbereich [238, 249] konnten die beiden Zeitkonstanten den entsprechenden Prozessen schließlich zugeordnet werden. Dabei wird der Produktzustand mit der schnelleren Zeitkonstante von etwa 2 ps gebildet und die Rekombinierung in den Grundzustand erfolgt mit der längeren Zeitkonstante von ca. 7 ps.

2.3 Vergleich von BR mit HR

Wie in den Abschnitten 2.1 und 2.2 beschrieben wurde, weisen BR und HR große strukturelle Ähnlichkeiten auf. Dies umfasst sowohl die Primärstruktur, die Aminosäuresequenz [64, 65, 202, 211, 250], als auch die Sekundärstruktur bestehend aus den sieben α -Helices mit dem zentralen Retinalchromophor [69, 215]. Da BR eine lichtgetriebene Protonenpumpe und HR eine lichtgetriebene Anionenpumpe darstellt, unterscheiden sich BR und HR trotz ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit wesent-

lich in ihrer biologischen Funktion.

Unter nativen Bedingungen (1-Photonenprozess) kann **HR** nur Chloridionen in die Zelle transportieren. Unter besonderen experimentellen Bedingungen (2-Photonenprozess) jedoch ist HR in der Lage, Protonen in die Zelle zu transportieren [204, 251]. Damit verläuft die Richtung des Protonentransports in HR entgegengesetzt zur Transportrichtung in BR.

Ähnlich zu HR kann **BR** unter bestimmten Bedingungen Anionen binden. Erfolgt bei BR eine Protonierung der Position 85 ($\text{pH} < 3$), entsteht die sogenannte saure Blaue Membran von BR, die jedoch keine Protonen mehr transportieren kann. Stattdessen kann BR nun sowohl Chlorid- als auch Bromidionen binden und eventuell auch pumpen [95, 252–255]. Damit führt die Änderung des Protonierungsgrades einer einzelnen Aminosäure (Asp85) dazu, dass BR von einer auswärtsgerichteten Protonenpumpe in eine einwärtsgerichtete Anionenpumpe konvertiert werden kann. Wird an die Position 85 der sauren Blauen Membran ein Chloridion gebunden, ergibt sich die sogenannte saure Violette Membran von BR [77, 118, 256–261], die analog zu HR Chloridionen ins Zytoplasma transportieren kann [252, 262]. Die Position 85 scheint analog zum Gegenion in Rhodopsin [263] bei der biologischen Funktion des Proteins eine wichtige Rolle zu übernehmen. In der Primärreaktion im Femto- und Pikosekundenbereich verlangsamt sich die Lebensdauer des ersten angeregten Zustandes signifikant, wenn BR in Blauer Membran vorliegt oder eine geladene Aminosäure in der Nähe der Schiffischen Base neutralisiert wird [22, 25, 264, 265]. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes beträgt im BR Wildtyp 0.5 ps. Bei Mutanten mit protoniertem Asp85 tritt ein biexponentielles Verhalten mit zwei deutlich längeren Zeitkonstanten von 1.5 ps und 10 ps auf. Die Quantenausbeute der Isomerisierung sowie die im K-Intermediat gespeicherte Energie bleiben dabei unverändert. Folglich hat der Protonierungszustand von Asp85 einen katalytischen Effekt auf die Zerfallsrate des angeregten Zustandes und übt einen wichtigen Einfluss auf die Art des Ionentransports aus.

2.4 Mutante D85T

Da die Aminosäure Asp85 und ihr Protonierungsgrad einen wichtigen Einfluss auf die Primärreaktion und die Art des Ionentransports ausüben, wurde die Position 85 im BR Wildtyp gezielt mutiert. Am BR Wildtyp wurde eine Punktmutation vorgenommen, indem das Aspartat 85 (Asp, D) (Abb. 2.16 a)) durch ein Threonin (Thr, T) (Abb. 2.16 b)), durch ein Serin (Ser, S) oder ein Asparagin (Asn, N) ersetzt wurde. Die hergestellten Mutanten werden mit D85T, D85S und D85N bezeichnet, je nachdem welche ungeladene Aminosäure T, S oder N das ursprüngliche Aspartat D an der Position 85 ersetzt. Da die Protonierung der Aminosäure Asp85 einen wichtigen Schritt im Photozyklus von BR darstellt, ähneln Mutanten, in denen Asp85 keine negative Ladung besitzt, bestimmten Intermediaten im Photozyklus. Außerdem ist die Mutante D85T interessant, da sich an der Position 85 in der Nähe der Schiff-

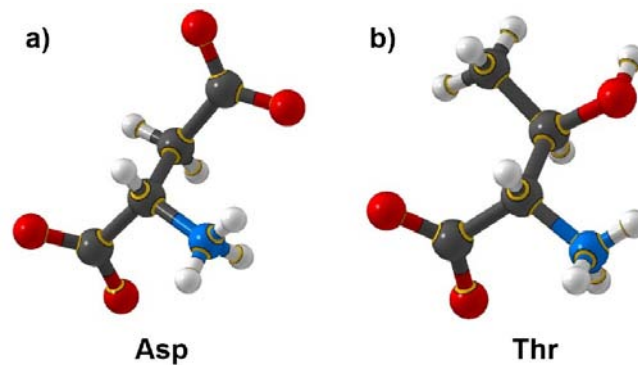


Abbildung 2.16: Darstellung der Aminosäuren [266]: a) Aspartat, wie es an der Position 85 in BR vorliegt, die sich in der Nähe der Schiffischen Base befindet, und b) Threonin, das in HR die Position Thr111 in der Nähe der Schiffischen Base einnimmt.

schen Base anstatt des Aspartats ein Threonin befindet, so dass sie in der Nähe der Schiffischen Base strukturell mit HR übereinstimmt.

Die Punktmutation an BR (D85T oder D85S) kann die lichtgetriebene Protonenpumpe BR in eine lichtgetriebene Anionenpumpe konvertieren [146, 254, 267–269]. Durch die Mutation kann das Protein analog zu HR Anionen (Chloridionen, Bromidionen sowie Nitrationen [146, 254, 268]) in die Zelle transportieren. Im Gegensatz zu BR erfolgt allerdings in der Mutante keine Deprotonierung der Schiffischen Base im katalytischen Photozyklus [268, 269]. Zusammen mit der sehr ähnlichen Struktur scheint der Mechanismus für den Ionentransport in BR und HR ähnlich oder sogar identisch abzulaufen. BR enthält also auch strukturelle Eigenschaften, die für einen Anionentransport erforderlich sind. Außerdem bewirkt die Punktmutation nicht nur eine Änderung der Ionenselektivität, sondern auch eine Umkehrung der Transportrichtung.

2.4.1 Struktur der Mutante

Mittlerweile stehen mehrere Röntgenkristallstrukturen der Mutante D85S mit einer Auflösung von bis zu 2 Å zur Verfügung: eine substratfreie Struktur ohne gebundenes Anion sowie substratgebundene Strukturen mit Bromidion oder Nitration [270–272]. Die ermittelten Strukturen sind auf die Mutante D85T übertragbar.

Wird in BR durch Mutation das Gegenion Asp85 der Schiffischen Base entfernt, treten verschiedene Veränderungen in der gesamten Struktur auf [273].

Für die anionenfreie Struktur von D85S, in der keine Anionen zum Transport vorhanden sind, ist die Elektronendichte der **Bindungstasche** in Abb. 2.17 dargestellt, wobei die jeweiligen Abstände der funktionellen Gruppen zueinander in Å angegeben sind. Das Retinal in der Mutante D85S besitzt eine *all-trans* Konfiguration [270]. In der substratfreien Struktur befindet sich über Wasserstoffbrücken gebunden ein einzelnes Wassermolekül, das Wassermolekül 402, zwischen der Schiffischen Base, dem

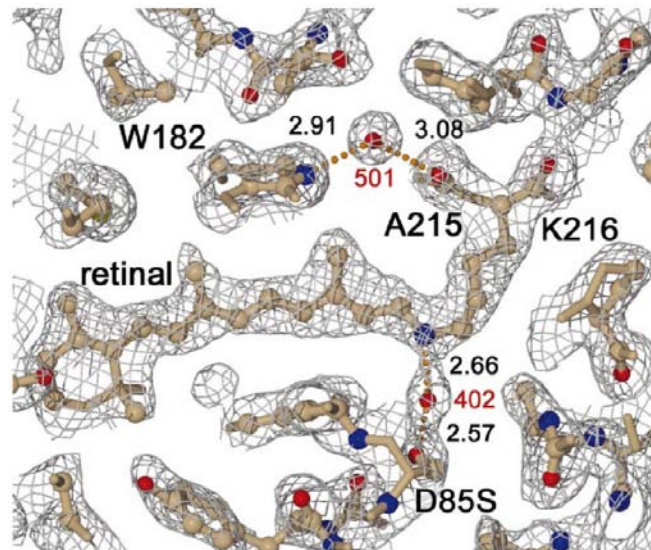


Abbildung 2.17: Darstellung der Bindungsstelle von D85S ohne Anion [270]. Das Retinal ist über ein Wassermolekül 402 an die Aminosäure 85 gebunden. Die Abstände zwischen den einzelnen Gruppen sind in Å angegeben.

Ser85 und dem Asp212. Die Bindungslängen der Schiffischen Base sowie der OH-Gruppe von Ser85 zum Wassermolekül betragen jeweils ca. 3 Å. Im Vergleich zu BR ist in der Mutante D85S das Wassermolekül 402 um etwa 1 Å näher an der OH-Gruppe der Aminosäure Ser85 lokalisiert als das Wassermolekül an der korrespondierenden C=O-Gruppe des Asp85 im BR Wildtyp. Das Wassermolekül 402 wird in der Mutante D85S näher an das Serin gebunden, da die mutierte Seitenkette Serin ein kleineres Volumen als die korrespondierende Aminosäure Aspartat in BR einnimmt. Wenn kein Anion in der Mutante D85S vorhanden ist, wird diese Position durch das Wassermolekül 402 besetzt. In Gegenwart von Anionen jedoch kann ein Anion direkt in die Nähe von Ser85 gebunden werden. Das Anion (Bromidion BR1 in Abb. 2.18) tritt an die Stelle des Wassermoleküls, indem eine enge Ionenpaarwechselwirkung zwischen der Schiffischen Base und dem gebundenen Anion ausgebildet wird. In der näheren Umgebung des Bromidions befinden sich das Ser85, die Schiffische Base sowie die Aminosäure Asp212. Die Schiffische Base kompensiert dabei effektiv den Energieverlust für die Anionenbindung in der Umgebung durch eine niedrige Dielektrizitätskonstante [274, 275]. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich von der OH-Gruppe des Asp85 zur C=O-Gruppe von Arg82 sowie zum Stickstoffatom des Rückgrats von Trp86 jeweils mit einem Abstand von ca. 3 Å aus. Die Aminosäure Asp212, die sich 3.44 Å von Ser85 entfernt befindet, besitzt keine Wasserstoffbrücke zum Wassermolekül 402, sondern wird durch die beiden OH-Gruppen von Tyr185 und Tyr57 im Abstand von ca. 2 Å und 2.5 Å stabilisiert.

Im Bereich der **Helices** werden Unterschiede in der Helixanordnung beobachtet. Nicht alle Helices behalten ihre Ausgangskonformation, die in BR eingenommen wird,

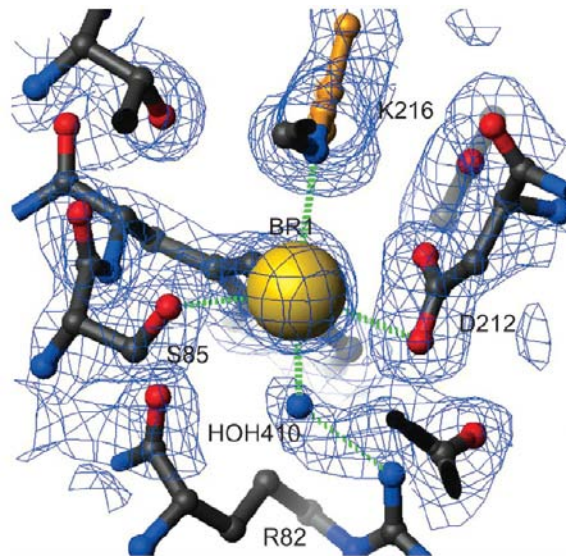


Abbildung 2.18: Die Bindungstasche der Mutante D85S mit gebundenem Bromidion (BR1) [271]. Ein Anion wird in der Nähe von Ser85 gebunden und befindet sich benachbart zu den Aminosäuren Asp212 (D212) und Lys216 (K216) am Retinal.

bei. Insbesondere macht sich in der Helix E ein auffallendes Kippen im EC-Halbkanal nach außen hin bemerkbar.

2.4.2 Eigenschaften

Die Neutralisierung der Aminosäure Asp85 hat nicht nur strukturelle Veränderungen zur Folge, sondern wirkt sich auch auf das stationäre Absorptionsmaximum aus. Reines Retinal absorbiert im blauen Spektralbereich zwischen 360 und 450 nm. Aufgrund der Bindung an das Protein ergibt sich der sogenannte Opsinshift, so dass BR ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{max}=567$ nm aufweist [14], das über einen weiten pH-Wertbereich von 6 bis 12 konstant bleibt. Dabei übt die Anwesenheit von Chloridionen keinen Einfluss auf das Absorptionsmaximum aus [276]. Eine Neutralisierung der Aminosäure Asp85, entweder durch Protonierung von Asp85 (saure Blaue Membran) oder durch gezielte Mutation beispielsweise mit Threonin, induziert eine Rotverschiebung des BR-Absorptionsmaximums von $\lambda_{max}=567$ nm nach ca. 615 nm [267, 268, 277–279]. Sind in der Mutante ausreichend überschüssige Anionen vorhanden, kann ein Anion in der Nähe der Schiffchen Base gebunden werden. Dies führt wiederum zu einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums, deren Ausmaß von der Art des gebundenen Anions abhängt. Anionen üben eine abnehmende Verschiebung auf das Absorptionsmaximum in der folgenden Richtung Chloridion > Azidion > Bromidion > Nitration > Perchloration > Sulfation aus. Je nach Wahl des pH-Wertes kann das Absorptionsmaximum stetig in den blauen Spektralbereich zu

einem BR-ähnlichen Absorptionsmaximum verschoben werden [146, 268, 269]. Wenn der pH-Wert zwischen 6 und 7 titriert wird, ergibt sich ein scharfer Übergang für das Absorptionsmaximum. Da sich das Anion in der unmittelbaren Nähe zum Retinalchromophor befindet, verursacht die Bindung des Anions eine signifikante Änderung der elektrostatischen Umgebung für das konjugierte Elektronensystem des Retinals. Anionen scheinen nur bei einem pH-Wert unterhalb des pK_a -Werts für den Übergang (zwischen 6 und 7) zu binden. Der pK_a -Wert des Übergangs wird vom Protonierungszustand der Aminosäure Asp212, deren pK_a -Wert 6.9 beträgt, bestimmt [146]. Bei einem pH-Wert unter 7 wird eine Anionenbindungsstelle erzeugt, die molekular ähnlich zu der von HR ist.

2.4.3 Photozyklus

Die Mutante D85T kann bei einem physiologischen pH-Wert drei verschiedene Transportmodi durchführen, die von den Lichtverhältnissen und der vorhandenen Ionenkonzentration abhängen: einwärtsgerichteter Protonentransport, auswärtsgerichteter Protonentransport und einwärtsgerichteter Chloridtransport [267, 269, 280, 281]. Im Folgenden wird nur der Photozyklus, der mit einem Chloridtransport verbunden ist, beschrieben, da unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit nur dieser Transportmodus auftreten kann. Für einen Chloridtransport sind eine Belichtung mit Wellenlängen im grünen Spektralbereich und eine ausreichend hohe Chloridkonzentration erforderlich. Der Photozyklus kann im IST-Modell mit der von BR und

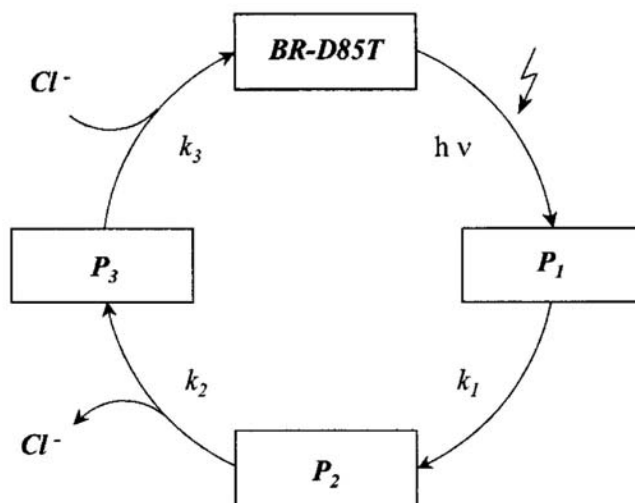


Abbildung 2.19: Photozyklus der Mutante D85T (Abbildung aus [282]). Nach lichtinduzierter Anregung $h\nu$ durchläuft D85T der Reihe nach die Intermediate P_1 , P_2 und P_3 , denen die Ratenkonstanten k_1 , k_2 und k_3 zugeordnet sind. Beim Übergang von P_2 zu P_3 erfolgt die Abgabe des Chloridions ins Zytoplasma. Während des Zerfalls von P_3 wird ein Chloridion aufgenommen und BR-D85T kehrt in den Ausgangszustand zurück.

HR bekannten Abfolge $I^*/T/S/T/I/S$ beschrieben werden, die sich aus sechs aufeinanderfolgenden Schritten zusammensetzt: einer Isomerisierung (I), einem Schalten der Zugänglichkeit (S) und einem Chloridtransport (T). Der Photozyklus von D85T berücksichtigt nicht die Primärreaktion im Pikosekundenbereich (Abb. 2.19). Nach einer lichtinduzierten Anregung erfolgt eine Isomerisierung des Retinals (I). Innerhalb mehrerer Nanosekunden entsteht ein rotverschobenes Intermediat P_1 , das dem K-Intermediat von BR und dem Intermediat HR_{600} ähnelt. Das rotverschobene Intermediat P_1 zerfällt unabhängig von der umgebenden Chloridkonzentration. Dabei entsteht ein neues Intermediat P_2 mit einem blauverschobenen Spektrum, dessen Verschiebung in HR wesentlich ausgeprägter ausfällt. Die spektrale Blauverschiebung kann durch eine veränderte Ladungsverteilung in der Nähe der protonierten Schiffsbasis hervorgerufen werden, die von der Transportbewegung des Chloridions durch die Schiffsbasis selbst verursacht wird (T). Nach dem Chloridtransport muss das Schalten der Zugänglichkeit (S) erfolgen, um eine Unidirektionalität des Transports zu garantieren. Vermutlich wird während der Relaxation des Intermediats P_2 das Chloridion an die CP-Seite abgegeben. Dieser Übergang weist nur eine leichte Abhängigkeit von der Chloridkonzentration auf, da die Rate k_2 mit steigender Chloridkonzentration nur geringfügig zunimmt. An der Chloridabgabe sind die beiden Aminosäuren Arg175 und Thr178 beteiligt, die den beiden Aminosäuren Arg200 und Thr203 in HR entsprechen [282], wobei das Thr178 die wesentliche Funktion bei der Chloridabgabe übernimmt und Arg175 sekundär nur in struktureller Hinsicht erforderlich ist. Das Intermediat P_2 zerfällt und geht in das Intermediat P_3 über. Der letzte Schritt umfasst die Rückisomerisierung des Retinals (I) und das zweite Schalten der Zugänglichkeit (S). Mit der thermischen Relaxation des Intermediats P_3 und der Aufnahme eines Chloridions in den EC-Halbkanal wird der Photozyklus abgeschlossen und die Mutante kehrt in ihren Ausgangszustand zurück. Die Quantenausbeute des Chloridionen-Transports ist um einen Faktor 10 geringer als die für den Protonentransport in BR [282].

2.4.4 Vergleich der Mutante D85T mit HR

Wenn man die Eigenschaften und den Photozyklus der Mutante betrachtet, treten einige wesentliche Übereinstimmungen mit charakteristischen Merkmalen von HR auf. Im Folgenden wird die Mutante D85T mit HR verglichen und es wird auf Ähnlichkeiten sowie auf graduelle Unterschiede eingegangen.

Die **Anionenbindung** in D85T unterscheidet sich von HR, da in D85T zuerst eine interne Gruppe protoniert werden muss, damit eine Anionenbindung überhaupt möglich wird. Als interne Gruppe kommt dafür die Aminosäure Asp212 in Frage. Eine andere Möglichkeit bestünde in dem protonierbaren Wasserstoffbrückennetzwerk [283], das seinerseits in der Lage wäre, die Elektrostatik in der Nähe der Schiffsbasis zu bestimmen, und damit auch das Absorptionsmaximum beeinflussen könnte. In HR entspricht der Aminosäure Asp212 von D85T die Aminosäure Asp238. Auch wenn ein Halogenidion die Bindungsstelle in HR besetzt, bleibt Asp238 negativ ge-

laden ohne direkt mit dem Halogenidion in Wechselwirkung zu treten. Stattdessen dient Asp238 als Gegenion direkt für die Schiffische Base und indirekt für die Aminosäure Arg108 über ein lokalisiertes Wassermolekül [215]. In der Mutante ist nur ein einziges Wassermolekül an der Wechselwirkung mit dem Halogenidion beteiligt, während in der Bindungsstelle von HR insgesamt drei Wassermoleküle vorhanden sind [215].

Die Chloridbindung verursacht in der Mutante eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums. In HR dagegen übt die An- oder Abwesenheit von Chloridionen keinerlei Einfluss auf das **Absorptionsspektrum** aus, so dass beide HR-Moleküle mit oder ohne Chloridionen das gleiche Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 578 nm, ähnlich zu lichtadaptiertem BR, aufweisen [205, 276, 284].

Um bei BR den Photozyklus zu starten, muss es zuerst lichtadaptiert werden, um zu 100 % die *all-trans* Konfiguration herzustellen. Im Gegensatz dazu führt eine **Lichtadaptation** bei der Mutante und bei HR nicht zu einer vollständigen Konversion des Retinals in den *all-trans* Zustand, sondern es liegt stets eine Heterogenität von *all-trans* und *13-cis* Isomeren vor [227–229, 285].

Der **Photozyklus** von D85T weist zum Photozyklus von HR zwar große Übereinstimmungen auf, jedoch verfügt die Mutante über eine zwanzigfach kleinere Affinität, Chloridionen zu binden als HR [146, 282]. HR zeigt die gleiche Abfolge von Prozessen, unterscheidet sich aber im zweiten Schritt des Chloridtransports. Der Zerfall des Intermediats HR₅₂₀, der mit einer Abgabe eines Chloridions an das Zytoplasma verbunden ist, hängt von der umgebenden Chloridkonzentration ab. Eine steigende Chloridkonzentration führt zu einer Verlangsamung des Zerfalls von HR₅₂₀. In der Mutante dagegen findet der Zerfall des korrespondierenden Intermediats P₂ viel schneller statt (mindestens um einen Faktor 10) und zeigt nahezu keine Chloridabhängigkeit.

3 Experimentelle Aufbauten und Probenpräparation

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Ultrakurzzeitexperimente und deren technische Realisierung vorgestellt. Es umfasst die zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimente sowie die zeitaufgelösten Pump-Probe-Experimente in transientser Absorption. Ferner wird kurz auf die Präparation der Proben und die Verfahren der Datenaufbereitung eingegangen.

3.1 Experimentelle Aufbauten

Zur Erzeugung von Laserimpulsen auf der Femtosekundenskala wurden drei Lasersysteme verwendet, die alle auf einem ähnlichen Prinzip beruhen (Abb. 3.1) [286, 287]. Ein Oszillator liefert Femtosekundenlaserimpulse als Seedimpulse im MHz-Bereich. Um Laserimpulse mit ausreichend hoher Energie zur Verfügung zu stellen, die für die nachfolgenden nichtlinearen optischen Prozesse erforderlich sind, wird die Energie der Laserimpulse in einem regenerativen Verstärker erhöht. Dazu passieren die Laserimpulse zunächst einen Expander, der die Laserimpulse in der Zeit streckt, damit die optischen Komponenten durch die hohen Spitzenintensitäten nicht zerstört werden. Anschließend durchlaufen sie den regenerativen Verstärker, in dem die Energien der Laserimpulse durch mehrere zeitliche Umläufe im Resonator deutlich verstärkt werden. Die zeitliche Streckung der verstärkten Laserimpulse wird durch einen Kompressor wieder kompensiert. Dabei liefern die hier verwendeten Lasersysteme, die bei einer Repetitionsrate von 1 kHz betrieben werden, typischerweise Energien von einigen Hundert μJ bei einer Zentralwellenlänge von ca. 800 nm und einer Impulsdauer zwischen 75 und 150 fs.

Da sich die Absorptionsbanden der zu untersuchenden Moleküle im sichtbaren Spek-

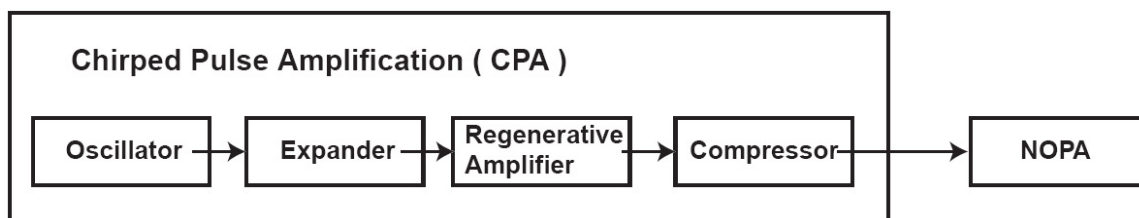


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines Oszillator-Verstärkersystems (CPA).

tralbereich befinden, müssen sich Laserimpulse in diesem Wellenlängenbereich durchstimmbare erzeugen lassen. Dies lässt sich durch das NOPA-Konzept (NOPA: non-collinear optical parametric amplification) realisieren [288–293]. Ein großer Vorteil dieses Konzepts besteht einerseits in der Erzeugung von sehr breitbandigen Impulsen, die die Erzeugung von sehr kurzen Impulsen unter 10 fs ermöglichen. Andererseits können Impulse über einen großen Spektralbereich von 450 nm bis zu 750 nm abgestimmt werden.

3.2 Transiente Fluoreszenzspektroskopie

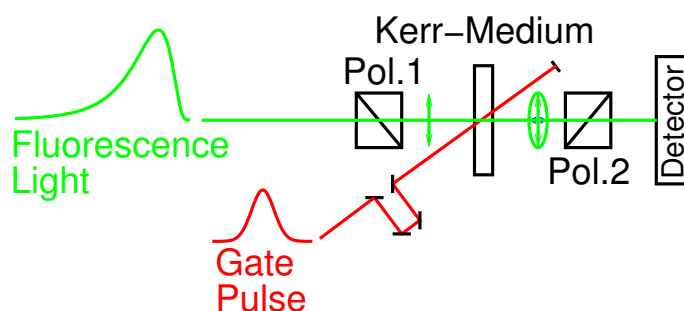


Abbildung 3.2: Prinzip des Kerr-Schalters.

Der Aufbau für die durchgeführten Fluoreszenzexperimente basiert auf dem sogenannten Kerr-Schalter-Prinzip (elektro-optischer Kerr-Effekt), dessen Funktionsweise im Folgenden näher erläutert wird (Abb. 3.2). Wenn das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht den ersten Polarisator passiert, entsteht linear polarisiertes Fluoreszenzlicht, das das Kerr-Medium durchläuft. Anschließend trifft es auf einen zweiten Polarisator, der senkrecht zum ersten Polarisator steht, so dass kein Fluoreszenzlicht den Detektor erreichen kann. Wird nun an das Kerr-Medium ein Schaltimpuls angelegt, erfährt das Kerr-Medium eine Doppelbrechung, so dass das linear polarisierte Fluoreszenzlicht beim Durchgang des Kerr-Mediums elliptisch polarisiert wird. Folglich kann ein Teil des polarisierten Fluoreszenzlichts den zweiten Polarisator passieren und zum Detektor gelangen.

Für die zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimente (Abb. 3.3), die auf dem Kerr-Schalter Prinzip basieren, stand als Laserquelle ein kommerzielles Oszillator-Verstärkersystem, ein CPA (engl. chirped pulse amplifier) von Clark (Clark CPA 2001), zur Verfügung [294, 295]. Dieses Lasersystem, das bei einer Repetitionsrate von 1 kHz arbeitet, liefert Laserimpulse mit einer Energie von $900 \mu\text{J}$ bei 775 nm und einer Impulsdauer von 150 fs. Die Ausgangsenergie des Lasersystems wird aufgeteilt: ein Teil dient zur Erzeugung der Anregungsimpulse und ein Teil zur Generierung der Schaltimpulse. Mit etwa einem Viertel der Ausgangsenergie, die das Lasersystem bereitstellt, wird ein zweistufiger NOPA betrieben, mit dem sich Anregungsimpulse vom sichtbaren

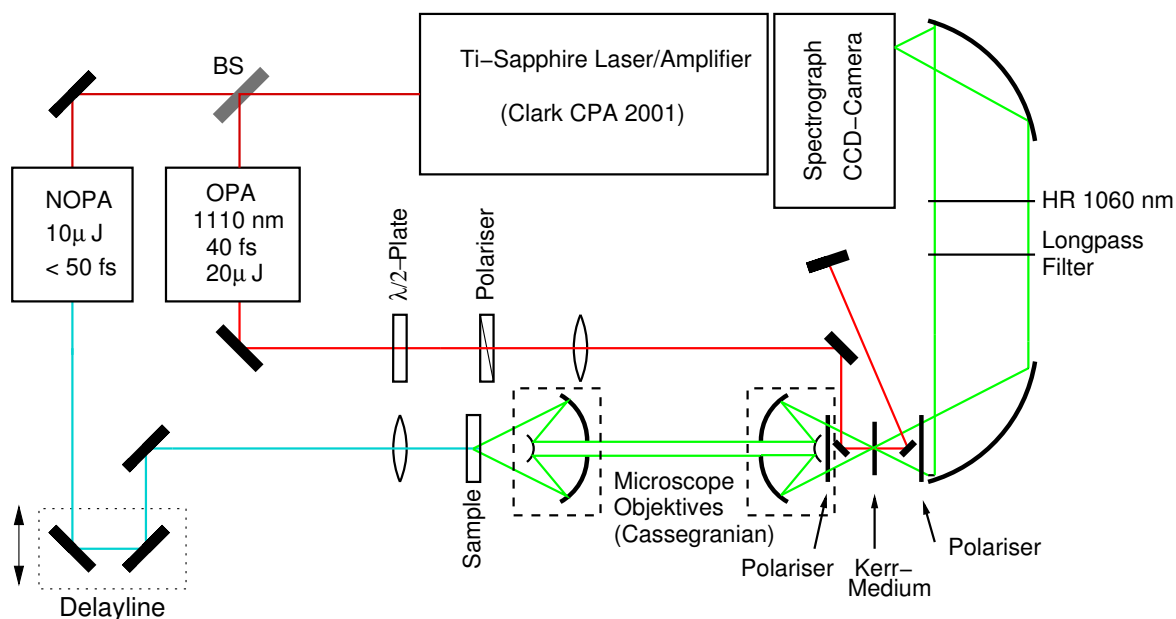


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des Kerr-Schalter Systems. Darstellung des Strahlengangs von Anregungsimpuls (blau) und Schaltimpuls (rot).

bis in den nahinfraroten Spektralbereich erzeugen lassen. Die erzeugten Impulse erreichen dabei eine Impulsenergie von $10 \mu\text{J}$. Die Energie der Anregungsimpulse wurde allerdings für die Messungen deutlich auf einen Wert unterhalb von $1 \mu\text{J}$ abgeschwächt, um lineare Anregungsbedingungen zu gewährleisten. Mit Hilfe eines Quarz-Prismenkompressors konnte die Impulsdauer der Anregungsimpulse auf unter 50 fs verringert werden. Nach der Komprimierung durchlaufen sie eine variabel einstellbare Verzögerungsstrecke, ehe sie auf eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm fokussiert werden. Die Probe in der Küvette absorbiert den Anregungsimpuls und emittiert Fluoreszenzlicht in alle Raumrichtungen.

Die verbleibende Ausgangsenergie des Lasersystems dient zur Erzeugung der Schaltimpulse im nahinfraroten Wellenlängenbereich. Mit diesem Anteil wird ein zweistufiger kollinear optisch parametrischer Verstärker (OPA) gepumpt. Der OPA generiert Laserimpulse bei einer Wellenlänge von 1110 nm , die typischerweise eine Energie von $20 \mu\text{J}$ und eine Impulsdauer von 40 fs aufweisen. Als Schaltimpulse könnten auch direkt die Impulse der Laserfundamentale bei 775 nm aus dem Oszillator-Verstärkersystem verwendet werden, was experimentell einen geringeren Aufwand bedeuten würde. Diese Methode hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass nur ein geringerer Spektralbereich des Fluoreszenzlichts geschaltet werden kann und nur eine reduzierte Zeitauflösung erreicht wird. Die Verwendung eines Schaltimpulses im nahinfraroten Spektralbereich eröffnet die Möglichkeit, das Fluoreszenzlicht über einen größeren Spektralbereich von 350 nm bis zu 1000 nm zu schalten. Damit ist diese Methode effizienter als breitbandige Up-Conversion, da das gesamte Fluores-

zenzspektrum simultan geschaltet werden kann.

Im Experiment wird das emittierte Fluoreszenzlicht durch zwei Cassegrain-Objektive aufgesammelt und auf das Kerr-Medium (hier: Quarzglas) abgebildet. Als Polarisatoren werden zwei Drahtgitterpolarisatoren verwendet, die vor und hinter dem Kerr-Medium platziert sind. Die gestreuten Anregungs- und Schaltimpulse werden herausgefiltert, ehe das geschaltete Fluoreszenzlicht in einem Spektrographen spektral aufgelöst und mit einer CCD-Kamera detektiert wird. Im Experiment wurde eine zeitliche Auflösung von ca. 150 fs erreicht.

Die genauen technischen Details der experimentellen Realisierung sowie Korrekturverfahren und die Bestimmung der Anregungsdichten können in den Referenzen [294–297] nachgelesen werden.

3.3 Transiente Absorptionsspektroskopie

In den folgenden beiden Experimenten wurde die Anreg-Abtast-Spektroskopie (Pump-Probe-Spektroskopie) verwendet. Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe mit einem ultrakurzen Laserimpuls angeregt und damit ein nichtstationärer Gleichgewichtszustand präpariert. Im Gegensatz zum vorherigen Aufbau wird die induzierte Transmissionsänderung mit einem zweiten Laserimpuls, der in der Intensität deutlich geringer ist als der Anregungsimpuls, abgetastet. Durch Variation der relativen Zeitverzögerung zwischen dem Anregungs- und Abtastimpuls können die induzierten Transmissionsänderungen indirekt in der Zeit verfolgt werden.

3.3.1 Transiente Absorptionsspektroskopie mit breitbandigem Weißlichtkontinuum als Abtastimpuls

Die Durchführung der zeitaufgelösten Femtosekunden-Absorptionsexperimente, deren experimenteller Aufbau in Abb. 3.4 dargestellt ist, erfolgte mit Hilfe eines selbstgebauten Titan-Saphir Oszillator-Verstärkersystems [35, 298–302]. Der Oszillator arbeitet mit einer Repetitionsrate von 90 MHz und erzeugt Seedimpulse für den regenerativen Verstärker mit einer Energie von 2 nJ und einer Impulsdauer von 25 fs. Das Oszillator-Verstärkersystem liefert mit 1 kHz Laserimpulse mit einer Energie von insgesamt 0.8 mJ, wobei die Impulse eine Zentralwellenlänge von 800 nm und eine Impulsdauer von 90 fs aufweisen. Da dieses Lasersystem zwei Experimente mit Laserimpulsen versorgen muss, steht für die zeitaufgelösten transienten Absorptionsexperimente im sichtbaren Spektralbereich nur ein Teil der gesamten Energie von 0.2 mJ zur Verfügung. Die Gesamtenergie dient einerseits zur Anregung der Probe und andererseits zum Abtasten der in der Probe induzierten Transmissionsänderungen.

Für die durchgeführten Experimente an den Retinalproteinen (Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin und den Mutanten D85T) wurden Anregungsimpulse im sichtbaren Spektralbereich zwischen 570 nm und 600 nm gewählt, die mit Hilfe eines zweistufi-

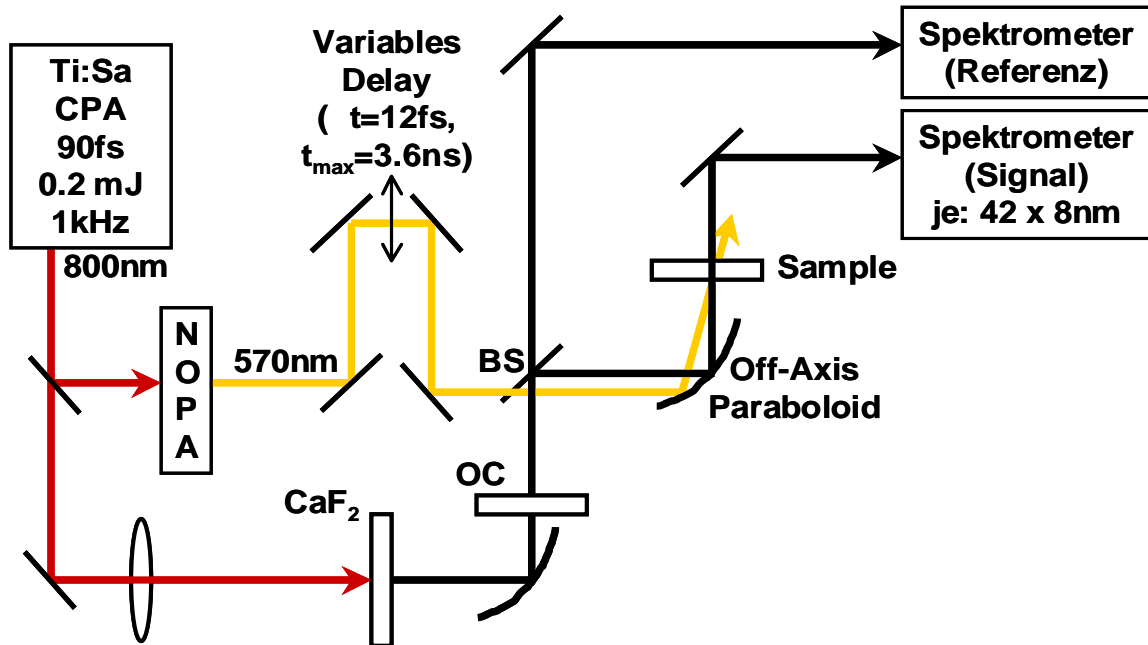


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau des transienten Absorptionsexperiments mit einem Weißlichtkontinuum als Abtastimpuls. Der Strahlengang des Anregungsimpulses ist in gelb gekennzeichnet, der Strahlengang des Abtastimpulses in rot.

gen NOPA erzeugt wurden. Durch die Verwendung eines Quarz-Prismenkompressors konnten die sichtbaren Laserimpulse auf eine Impulslänge mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von 100 fs komprimiert werden. Um die zeitliche Verzögerung zwischen Anregungsimpuls und Abtastimpuls variabel anzupassen, wurde eine Verzögerungseinheit eingesetzt, deren Verzögerungsstrecke mit einer Schrittweite von 12 fs bis zu maximal 3.6 ns eingestellt werden konnte. Nach der Verzögerungseinheit wurde ein Chopper implementiert, um eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im Messsignal zu erzielen. Die Anregungsdichten im Experiment wurden ferner geeignet abgeschwächt, um lineare Anregungsbedingungen zu garantieren.

Der andere Teil der Gesamtenergie dient zur Erzeugung der erforderlichen Abtastimpulse. Für die Abtastimpulse wurde ein Weißlichtkontinuum (350 nm bis 750 nm) verwendet. Zur Erzeugung des Weißlichtkontinuums werden die 800 nm-Laserimpulse auf ein bewegliches CaF_2 -Plättchen fokussiert [303]. Die Verwendung von CaF_2 gegenüber Saphir hat den entscheidenden Vorteil, dass auch in einem spektralen Bereich unterhalb von 450 nm Weißlicht erzeugt werden kann. Die Laserfundamentale von

800 nm, die noch im Weißlicht enthalten ist, wird mittels eines dielektrischen Spiegels (OC in Abb. 3.4) entfernt. Über einen Paraboloidspiegel werden die Anregungs- und Abtastimpulse unter magischem Winkel auf eine Quarzküvette mit einer optischen Weglänge von 500 μm (Spezialanfertigung von Hellma) fokussiert. Vor der Probe werden die Abtastimpulse in Referenzimpulse und Abtastimpulse mit einem Strahlteiler (BS in Abb. 3.4) aufgeteilt. Die in der Probe induzierten Absorptionsänderungen werden mit Hilfe eines Multikanalsystems detektiert, das es ermöglicht, eine spektrale Bandbreite von 430 nm bis 760 nm simultan mit einer Auflösung von 8 nm abzutasten [304]. Zunächst erfolgt eine Mittelung der Signale über 1000 Messpunkte, bevor das Verhältnis aus Abtastsignal und Referenzsignal gebildet wird. Noch genauere Beschreibungen dieses experimentellen Aufbaus lassen sich in Arbeiten [35, 298–302] finden.

3.3.2 Transiente Absorptionsspektroskopie mit einem NOPA-Abtastimpuls

Für diese transienten Absorptionsexperimente mit hoher Zeitauflösung, die für das kohärente Kontrollexperiment vibronischer Wellenpakete an Oxazin 1 verwendet wurden, diente ein Lasersystem, das wiederum auf einem selbstgebauten Oszillator-Verstärkersystem basiert [305, 306]. Der experimentelle Aufbau ist schematisch in Abb. 3.5 dargestellt.

Ein diodenlasergepumpter Titan-Saphir Oszillator liefert mit einer Wiederholungsrate von 100 MHz kurze Laserimpulse von 26 fs, die eine Leistung von 200 mW bei einer Wellenlänge von 800 nm aufweisen. Nachdem die Laserimpulse den regenerativen Verstärker durchlaufen haben, stehen Impulse bei 1 kHz mit weniger als 75 fs zur Verfügung, deren Energie 350 μJ bei 800 nm beträgt. Mit dieser Ausgangsenergie werden zwei einstufige NOPAs betrieben, die Laserimpulse im sichtbaren Spektralbereich zwischen 470 nm und 720 nm durchstimmbare erzeugen können. Da die Laserimpulse im NOPA beim Durchgang durch mehrere dispersive optische Materialien eine Dispersion erfahren, wurde bei der technischen Realisierung darauf geachtet, möglichst reflektive Optik und nur wenige dünne Materialien zu verwenden. Dadurch lassen sich sehr breitbandige Spektren bis zu 200 nm generieren, um sehr kurze Laserimpulse unterhalb von 10 fs zu erzeugen. Für die Kompensation der restlichen Dispersion konnten verschiedene Arten von Kompressoren verwendet werden: ein Quarz-Prismenkompressor [307], ein Gitterkompressor [308] sowie ein Impulsformer. Durch einen Prismenkompressor kann nur der lineare Chirp (zeitliche Abhängigkeit der Momentanfrequenz) des Impulses ausgeglichen werden. Erst ein Gitterkompressor in Kombination mit einem Prismenkompressor erlaubt auch die Einflussnahme auf den quadratischen Chirp [309]. Allerdings lassen sich höhere Ordnungen des Chirps (ab dritter Ordnung) nicht mehr mit diesen beiden Kompressoren korrigieren. Um diese höheren Ordnungen des Chirps dennoch zu regulieren, die gerade bei immer kürzeren Impulsen an Bedeutung gewinnen und eine Kompression

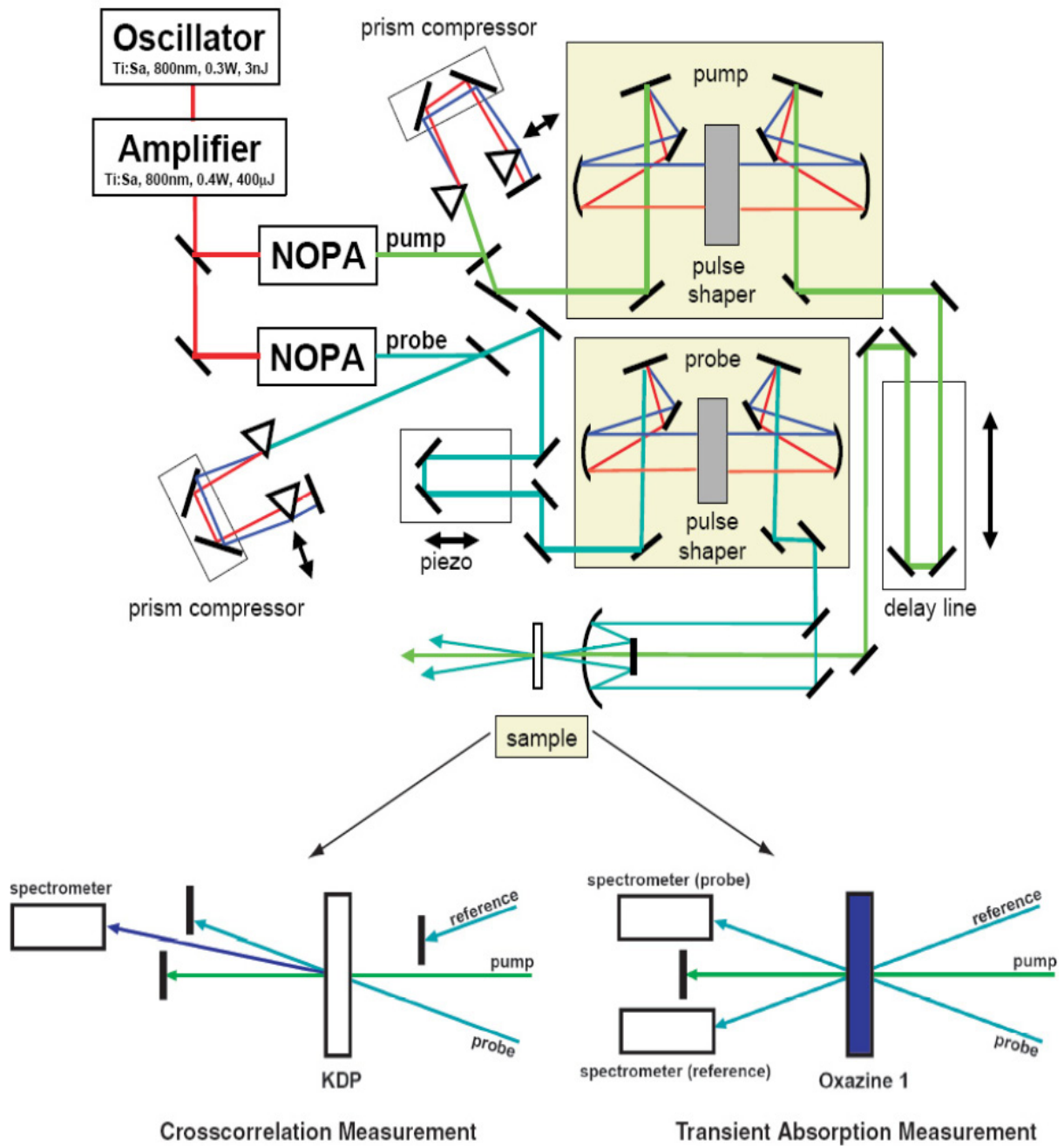


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau der transienten Absorptionsexperimente mit hoher Zeitauflösung.

bis auf das Fourierlimit verhindern, kommt ein Impulsformer zum Einsatz. Dieser erlaubt es, die Phase sowie das Spektrum des Impulses beliebig zu manipulieren [310–313].

Im Folgenden wird der Aufbau und die Funktionsweise des Impulsformers kurz beschrieben. Im Aufbau wurde auf Linsen verzichtet und nur reflektive Optik verwendet, um auftretende Dispersion und Verluste weitestgehend zu minimieren.

Der Impulsformer weist eine 4f-Geometrie auf: Zunächst wird der einfallende Laserimpuls mit Hilfe eines Gitters möglichst littrownah räumlich in seine spektralen Komponenten aufgespalten. Die einzelnen Farbkomponenten werden, nachdem sie einen Faltspiegel passiert haben, durch einen Zylinderspiegel auf eine Ebene (Fourierebene) fokussiert. Eine spiegelsymmetrische Anordnung, die wiederum aus einem Zylinderspiegel, einem Faltspiegel und einem Gitter besteht, sorgt für die entsprechende Rücktransformation des Impulses. In der Fourierebene befinden sich zwei identische Polarisatoren, zwischen denen zwei lineare Flüssigkeitsarrays (LCD, von LOT CRI:SLM-256-VIS) platziert sind. Diese beiden LCDs, die in Reihe nacheinander geschaltet sind, bestehen jeweils aus 128 Pixeln, wobei jeder einzelne Pixel ein doppelbrechendes Medium darstellt. Wird an einen Pixel eine Spannung angelegt, kann der außerordentliche Brechungsindex verändert werden und somit die Polarisation des transmittierenden Impulses variiert werden. Nachdem der Impuls den ersten Polarisator durchlaufen hat, entsteht ein linear polarisierter Impuls. Ist an das LCD eine Spannung angelegt, wird eine definierte kontrollierbare Änderung des Brechungsindex induziert, so dass der linear polarisierte Impuls bei der Transmission durch das LCD eine elliptische Polarisation erfährt. Nach dem zweiten Polarisator liegt wieder ein linear polarisierter Impuls vor. Aus der Variation der Brechungsindizes ergeben sich unterschiedliche optische Wege, die die spektralen Komponenten zurücklegen müssen. Damit kann beliebig auf den Phasenverlauf des Impulses Einfluss genommen werden: der Impuls kann komprimiert oder gezielt mit einem bestimmten Chirp versehen werden. Man benötigt zwei LCDs, um die Phase und die Amplitude unabhängig voneinander zu variieren. Eine Manipulation der Amplitude ermöglicht die Erzeugung eines gewünschten Impulsspektrums. Eine genauere Beschreibung der Implementierung des Impulsformers mit entsprechender Ansteuerungssoftware findet sich in [314, 315].

Nachdem die Anregungs- und Abtastimpulse durch die genannten Methoden komprimiert und gegebenenfalls entsprechend manipuliert worden sind, werden sie zum Messplatz geführt. Auf diesem Weg durchläuft der Anregungsimpuls eine einfach gefaltete Verzögerungseinheit, deren Strecke mit einer Genauigkeit von 1.7 fs bis maximal 1.8 ns variabel eingestellt werden kann. Der Abtastimpuls wird vor dem Probenort in zwei identische Impulse aufgespalten, wobei der eine Impuls als Referenzimpuls und der andere Impuls als Probeimpuls dient. Der Referenzimpuls erreicht die Küvette zeitlich vor dem Probeimpuls. Im Gegensatz zu der beschriebenen Laseranlage in Abschnitt 3.3.1 propagieren alle drei Impulse (Anregungsimpuls, Probeimpuls sowie Referenzimpuls) durch das identische Probenvolumen in der Küvette. Die Anregungsimpulse induzieren eine Transmissionsänderung in der Probe, die als Messsignal aufgenommen werden. Die transmittierten Referenz- und Probeimpulse werden über zwei Spektrometer mit einer Auflösung von 6 nm bzw. 2 nm spektral detektiert. Aus dem Verhältnis der Intensität des Probeimpulses und des Referenz-

impulses ergibt sich das induzierte Transmissionsverhalten der Probe. Die Datenaufnahme einer einzelnen Transiente erfolgte zunächst im Einzelschussbetrieb, wobei anschließend eine Mittelung über 100 Laserschüsse durchgeführt wurde.

Impulscharakterisierung

Um eine genaue Information über die verwendeten Laserimpulse zu erhalten, wurden verschiedene Verfahren zur Impulscharakterisierung eingesetzt. Da elektronische Methoden zu langsam sind, um Laserimpulse auf der Femtosekundenskala direkt zeitlich zu analysieren, wurde hier auf indirekte Verfahren zurückgegriffen, die auf nichtlinearen optischen Prozessen basieren. Im Folgenden wird auf die zwei verwendeten Diagnoseverfahren zur Impulscharakterisierung eingegangen: die Autokorrelation und den Kreuzkorrelationsfrog.

Autokorrelation: Für die Impulsdiagnose im Experiment wurde eine sogenannte hintergrundfreie Autokorrelation durchgeführt [316]. Dabei wird der zu analysierende Impuls symmetrisch in zwei Replika des Originalimpulses aufgeteilt, die ein modifiziertes Mach-Zehnder-Interferometer durchlaufen, in dem die zeitliche Verzögerung zwischen den beiden Impulsen relativ zueinander variiert werden kann. Am Ausgang des Interferometers werden die beiden Impulse wieder vereinigt und in einem nichtlinearen Kristall (BBO-Kristall) unter einem Winkel zur Summenfrequenzerzeugung überlagert. Das frequenzverdoppelte Signal wird mit Hilfe eines Photomultipliers integral als Funktion der relativen Zeitverzögerung der beiden Impulse zueinander detektiert. Da die Autokorrelation einen χ^2 -Prozess darstellt, der symmetrisch zum Zeitnullpunkt verläuft, kann keine Information über die Phase des Impulses gewonnen werden.

Kreuzkorrelation: Da mit einer Kreuzkorrelation Informationen über die Phase eines Impulses gewonnen werden kann, wurde zusätzlich ein Kreuzkorrelationsfrog verwendet [317–319].

Der Kreuzkorrelationsfrog wurde am Probenmessplatz des Pump-Probe-Experiments durchgeführt, damit die charakterisierten Impulse und die für die zeitaufgelösten Messungen verwendeten Impulse identisch sind. Dazu wird ein Impuls, z. B. der Pumpimpuls, spektral eingeschränkt, wodurch ein zeitlich langer Impuls entsteht. Dieser dient zur Charakterisierung des anderen Impulses (des Probeimpulses). Beide Impulse werden auf einen dünnen nichtlinearen Kristall (KDP-Kristall) zur Summenfrequenzerzeugung gegeben. Die zeitliche Verzögerung zwischen den beiden Impulsen ist variabel einstellbar, so dass das Summenfrequenzsignal für jede Wellenlänge in Abhängigkeit von der zeitlichen Verzögerung der beiden Impulse detektiert wird. Aus der Kenntnis der Zentralwellenlänge des Pumpimpulses kann ermittelt werden, zu welcher Verzögerungszeit jede Wellenlänge ihr Intensitätsmaximum erreicht, und somit die Phasendispersion des Probeimpulses bestimmt werden.

Bei der Charakterisierung des Pumpimpulses wird analog vorgegangen. Diesmal wird

der Probeimpuls spektral eingeschränkt und wiederum das Summenfrequenzsignal aus Pump- und Probeimpuls detektiert, aus dem sich die genaue Phasendispersion des Pumpimpulses ableiten lässt.

Die genaue Information über die Phasendispersion beider Impulse bietet die Möglichkeit, die verschiedenen Ordnungen der Dispersion mit Hilfe der Impulsformer gezielt zu kompensieren.

3.4 Probenkreislauf

Da alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine (Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin und die Mutante D85T) einen Photozyklus von einigen Millisekunden durchlaufen, muss während der Messung das angeregte Probenvolumen nach jedem Laserschuss ausgetauscht werden. Andernfalls würden nachfolgende Intermediate im Photozyklus angeregt werden und somit keine identischen Anfangsbedingungen vorliegen. Zum kontinuierlichen Austausch der Probe wurde ein Probenkreislauf konstruiert, der aus folgenden Hauptbestandteilen aufgebaut war: einem Vorratsgefäß, einer Schlauchpumpe (Ismatec) und einer Durchflussküvette (Hellma). Die Probe wird aus dem Vorratsgefäß mit Hilfe einer nachgeschalteten Pumpe, die den Kreislauf betreibt, über möglichst kurze und dünne Zuleitungen, da nur geringe Probenmengen zur Verfügung standen, angesaugt. Die Probe durchläuft die Schlauchpumpe und wird anschließend in die Durchflussküvette gepresst. Das angeregte Probenvolumen wurde aus der Küvette zurück in das Vorratsgefäß transportiert. Für die dünnen Zuleitungen wurde als Material Teflon gewählt mit Ausnahme des Abschnitts, der direkt durch den Pumpenkopf läuft. Bei der Verwendung von Teflon im Abschnitt des Pumpenkopfes hat sich gezeigt, dass Bakteriorhodopsin degradiert. Deshalb wurde für die Messungen an Bakteriorhodopsin und den Mutanten D85T ein Schlauch aus Viton verwendet, bei dem keine Degradierung der Probe stattfindet, was durch Messung des stationären Absorptionsspektrums überprüft wurde. Viton besitzt allerdings den Nachteil, dass der Schlauch nach ein bis zwei Stunden Messzeit ausgewechselt werden muss, da mit der Zeit durch die mechanische Beanspruchung der Pumpe Verschleisserscheinungen am Material auftreten. Für die Messungen an Halorhodopsin wurde ein Schlauch aus Ismaprene verwendet, dessen Material wesentlich stabiler und beständiger bleibt. Es zeigten sich keine Degradierungserscheinungen über 29 Stunden. Bevor die biologischen Proben in den Probenkreislauf gelangten, wurden sie kurz mit Ultraschall behandelt, um die Zahl der Streupartikel zu verringern.

3.5 Probenpräparation

Im Folgenden wird die Probenpräparation der untersuchten Proben beschrieben. Alle biologischen Proben mit Ausnahme von Oxazin sind mit ihren Eigenschaften bezüglich Puffer, pH-Wert, Salzkonzentration und Absorptionsmaximum in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

3.5.1 Oxazin

Für die zeitaufgelösten Kontrollexperimente wurde der Laserfarbstoff Oxazin 1 (Lambda-Physik: LC7250) ohne weitere Aufreinigung in Methanol (Merck: VLSI Selectipur) gelöst. Die Konzentration wurde so gewählt, dass die angesetzte Farbstofflösung in einer 50 μm Küvette eine optische Dichte von 1 OD am Absorptionsmaximum von 643 nm aufweist, das einer Konzentration von 0.19 mM entspricht. Das gesamte Volumen wurde durch eine Durchflussküvette gepumpt, um das angeregte Probenvolumen nach jedem Laserschuss völlig auszutauschen.

3.5.2 Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin, Mutante D85T

Bakteriorhodopsin

Alle Proben wurden in Martinsried am Max-Planck-Institut für Biochemie Gruppe Oesterhelt hergestellt. Dazu wurde Bakteriorhodopsin (BR) aus dem Stamm S9 gezüchtet, anschließend exprimiert und daraus isoliert. BR liegt eingebettet in Purpurmembran (PM) vor, was einer **nativen** Umgebung in der Natur entspricht [320]. Die Probenkonzentration entsprach einer optischen Dichte zwischen 26 OD und 34 OD bei einer Schichtdicke von 1 cm.

Um die Messungen bei definiertem pH-Wert und einer definierten Salzkonzentration durchzuführen, wurde BR in PM mit Kaliumphosphat gepuffert und eine definierte Salzkonzentration eingestellt. Dazu wurde eine 150 mM KCl-Lösung in Chromatographiewasser (Lichrosolv von Merck) angesetzt, die als Lösungsmittelgrundlage für die beiden Pufferbestandteile, Kaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 und Kalium-dihydrogenphosphat KH_2PO_4 , diente. Es wurde jeweils eine 20 mM K_2HPO_4 -Lösung und eine 20 mM KH_2PO_4 -Lösung in der 150 mM KCl-Lösung hergestellt. Die pH-Werte der K_2HPO_4 -Lösung und der KH_2PO_4 -Lösung betragen 8.7 bis 9.3 bzw. 4.3 bis 4.5. Durch geeignete Wahl des Verhältnisses aus der K_2HPO_4 -Lösung und der KH_2PO_4 -Lösung wurde ein pH-Wert des Puffers von 7.5 eingestellt. Es wurde so viel Puffer zur BR-Probe in PM gegeben, dass die Endkonzentration der BR-Probe mit Puffer bei einer Schichtdicke von 500 μm eine optische Dichte von 1 OD bei 568 nm (Absorptionsmaximum von BR) aufwies. Vor den Messungen wurde die Probe mit Hilfe einer Kaltlichtlampe (Schott, Modell KL2500 LCD mit einer Farbtemperatur von 3600 K) belichtet, deren ultraviolette und nahinfrarote Spektralanteile durch zwei Kantenfilter, OG 550 und KG 5, herausgefiltert wurden, um Schädigungen der Probe zu vermeiden. Insgesamt wurde die Probe 30 Minuten lang beleuchtet, um die Probe in den lichtadaptierten Zustand zu überführen. Die erfolgreiche Lichtadaptation wurde anhand einer stationären Absorptionsmessung (Perkin Elmer) überprüft, die sich in einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um 10 nm auf den neuen Wert von 568 nm bemerkbar macht. Das Vorratsgefäß der Probe wurde während der Messung kontinuierlich weiter belichtet, wobei ein Magnetrührer im Vorratsgefäß dafür sorgte, dass alle BR-Moleküle eine Lichtadaptation erfuhren. Nach den zeitaufgelösten Experimenten wurde nochmals das stationäre Absorptionsspek-

3 Experimentelle Aufbauten und Probenpräparation

Probe	Puffer	pH-Wert	Salz- konzentration	Absorptions- maximum λ_{max}
BR	20 mM KPO ₄	7.5	150 mM KCl	568 nm
HR ohne Salz	50 mM MOPS	7.5	0 M NaCl	576 nm
HR mit Salz	50 mM MOPS	7.5	4 M NaCl	575 nm
D85T 1	50 mM TRIS (HCl)	8.0	0 M NaCl	616 nm
D85T 2	50 mM TRIS (HCl)	8.0	1 M NaCl	617 nm
D85T 3	60 mM NaPi (NaOH)	6.0	0 M NaCl	615 nm
D85T 4	60 mM NaPi (NaOH)	6.0	1 M NaCl	565 nm

Tabelle 3.1: Übersicht der untersuchten Retinalproteine, BR, HR und den Mutanten D85T, mit ihren Präparationsbedingungen bezüglich Puffer, pH-Wert, Salzkonzentration und stationärem Absorptionsmaximum.

trum der Probe aufgenommen, um sicherzugehen, dass die Probe durch die Messung keinen Schaden genommen hat und noch intakt ist.

Die Durchpumpgeschwindigkeit wurde der Repetitionsrate des Lasersystems von 1 kHz und dem Probenvolumen aus Schichtdicke und Durchflusskanal so angepasst, dass die Probe zwischen jedem Laserschuss ausgetauscht wurde. Außerdem wurde im allgemeinen eine so geringe Anregungsintensität gewählt, dass eine Anregung in höher liegende elektronische Zustände nicht erfolgen konnte.

Halorhodopsin

Die Halorhodopsinproben (HR) wurden vom Max-Planck-Institut für Biochemie fertig bereitgestellt [321]. Beide Proben, die ebenfalls in Membran eingebettet vorlagen, enthielten MOPS (3-(N-Morpholin)-propansulfonsäure) als Puffer bei einem pH-Wert von 7.5. Die beiden Proben unterschieden sich in der Salzkonzentration. Nur in der einen HR-Probe liegt HR in einer hochmolaren Salzkonzentration von 4 M NaCl vor, im Gegensatz zur anderen HR-Probe, in der sich kein Salz befindet. In den zeitaufgelösten Absorptionsmessungen wurde bei diesen Proben vor und während der Messung keine Lichtadaptierung vorgenommen, da die Lichtadaptierung von HR keinen Effekt, d. h. keine Erhöhung des Anteils von all-*trans* Retinal, erzielen kann.

Mutante D85T

Die Proben der Mutante D85T wurden ebenfalls vom Max-Planck-Institut für Biochemie fertig bereitgestellt analog zu [267] und enthielten einen geeigneten Puffer bei vorgegebener Salzkonzentration und definiertem pH-Wert [322]. Es wurden vier verschiedene Proben, die ebenso in PM vorlagen, präpariert. Zum einen wurde die Mutante D85T bei einem pH-Wert von 6.0 unter Verwendung eines NaPi-Puffers präpariert und zum anderen bei einem pH-Wert von 8.0 durch eine Pufferung mit

TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan). Für jeden pH-Wert wurden jeweils zwei Proben hergestellt, die sich in der Salzkonzentration unterschieden, indem sie entweder kein Salz (Salzkonzentration < 1 mM NaCl) oder eine Salzkonzentration von 1 M NaCl enthielten. Die Eigenschaften aller vier präparierten D85T-Proben sind in der Tabelle 3.1 angegeben. Bei der Lichtadaptation wurde ebenso wie bei BR verfahren (siehe Abschnitt 3.5.2).

3.6 Datenauswertung und Analyse

Zur Datenauswertung und Datenanalyse standen folgende Prozeduren zur Verfügung [35, 298]:

Es wurde zunächst eine Mittelung über einzelne Transienten einer Probe vorgenommen, um die gemittelten Signale als Funktion der Verzögerungszeit und der Wellenlänge zu erhalten.

Die Abtastimpulse weisen nach dem Erzeugungsprozess einen großen linearen Chirp auf, der eine Verschiebung der Zeitnullpunkte der gemessenen Signale als Funktion der Wellenlänge verursacht. Daher wurde unter Verwendung eines theoretischen Modells eine Nullpunktkorrektur durchgeführt. In diesem Modell wurde die Verschiebung aus der Gruppengeschwindigkeitsdispersion, die beim Durchgang durch optische Materialien entsteht, anhand der Sellmaierkoeffizienten bestimmt.

Bei Bedarf konnte ferner der Signalbeitrag des reinen Lösungsmittels, in dem die Probe vorlag, von den Daten adäquat abgezogen werden, um bei Absorptionsmessungen das kohärente Artefakt um den Zeitnullpunkt zu eliminieren.

Die korrigierten Daten konnten visualisiert werden und weiteren Auswertungen unterworfen werden. Dazu wurden die Daten mit einem Ratengleichungssystem angepasst, bestehend aus einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit einer Gaussfunktion gefaltet wurde. Die Gaussfunktion stellt die Apparatefunktion dar, die ein Maß für die zeitliche Auflösung des Experiments angibt. Die Daten wurden mit einer geeigneten Zahl von Zerfallszeiten und dazugehörigen Amplituden beschrieben, deren Anpassung nach der Methode der kleinsten Quadrate mit einem Marquartalgorithmus erfolgte.

Für die Wellenpaketsbewegungen in Oxazin 1 wurde ein Fourierspektrum mit Hilfe einer Fouriertransformation berechnet. Zunächst wurden die langsamen Zerfallskinetiken des transienten Absorptionssignals von den Messungen subtrahiert. Das sich ergebende Residuum, das nur noch oszillatorische Anteile enthält, wurde fouriertransformiert. Eine genauere Beschreibung eines alternativen Verfahrens zur Evaluation von Fourierspektren kann in der Publikation [323] nachgelesen werden.

Die Messdaten von Halorhodopsin (HR) mit Salz wurden vor der Anpassung der Ratenkonstanten einer Glättung mit einem Savitzky-Golay-Algorithmus [324] unterzogen. Das Absorptionssignal von HR mit Salz weist einen sehr großen Streuuntergrund auf, der nahezu 70% des Gesamtsignals verglichen zum reinen HR-Signal ausmacht. Daher wurde im Experiment eine erhöhte Mittelung über 25000 Laserschüsse

durchgeführt. Diese Mittelung reichte jedoch noch nicht aus, um eine vergleichbare Datenqualität zu den anderen Proben zu erreichen. Daher wurde die Glättungsprozedur vorgenommen.

Die Zeitachse der Daten konnte ferner in eine rein logarithmische Zeitachse umgewandelt werden. Das Messprogramm verwendet eine linear-logarithmische Zeitachse. Im ersten Zeitbereich (typischerweise <2 ps) werden die Messpunkte in einem linearen Abstand aufgenommen. Zu späteren Zeitpunkten erfolgt die Datenaufnahme in einem logarithmischen Abstand. Bei der Datenanpassung können die Zeitkonstanten im linear gemessenen Zeitbereich, der deutlich mehr Punkte aufweist als der logarithmisch gemessene Zeitbereich, überbewertet werden. Daher wurde die Zeitachse der Daten für die Datenanpassung logarithmiert, um sicherzustellen, dass pro Dekade die gleiche Anzahl von Messpunkten vorhanden ist und damit eine gleichmäßige Gewichtung der verschiedenen Zeitkonstanten gegeben ist.

4 Manipulierte Pumpaktivitäten: Ultrakurzzeitspektroskopie von HR, BR und der BR-Mutante D85T

Wenn Retinal frei in Form einer protonierten Schiffsbasis vorliegt, kann es in Lösung unspezifisch um verschiedene C-C-Bindungen isomerisieren. Allerdings werden hier nur geringe Quantenausbeuten und kleine Reaktionsraten erreicht [14–17]. Im Gegensatz dazu führt das Retinal, wenn es im Protein (Bakterio-opsin) gebunden ist, eine Isomerisierungsreaktion um die spezifische C₁₃=C₁₄-Bindung durch. Die Quantenausbeute und die Reaktionsrate werden in diesem Fall deutlich erhöht [18–26]. Damit übt die Proteinumgebung und ihre Wechselwirkung mit dem Chromophor einen wesentlichen Einfluss auf die photochemische Reaktion des Retinals aus. Im folgenden wird der Einfluss der Proteinumgebung auf die Isomerisierungsreaktion anhand von Bakteriorhodopsin (BR), Halorhodopsin (HR) und der BR-Mutante D85T untersucht.

4.1 Stationäre Absorptionsspektroskopie

Die stationären Absorptionsspektren im sichtbaren Spektralbereich sind für die verschiedenen Proben, HR, BR sowie die BR-Mutante D85T, in Abb. 4.1 dargestellt. Das Absorptionsmaximum von HR liegt bei einer Wellenlänge von 578 nm (Abb. 4.1 a)), wobei die spektrale Position und die spektrale Form der Absorption nicht von der NaCl-Konzentration abhängt. Für beide präparierte HR-Proben mit Salz (4 M NaCl) und ohne Salz ergibt sich das gleiche Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 578 nm. Vergleicht man den Streuuntergrund der beiden HR-Proben, so zeigt die HR-Probe ohne Salz einen geringeren Streuuntergrund als die HR-Probe mit Salz.

In Abb. 4.1 b) werden die stationären Absorptionsspektren der vier Proben der BR-Mutante D85T (jeweils mit durchgezogener Linie) und von BR (gestrichelte Linie), dessen Absorptionsspektrum als Referenz dient, verglichen. Das Absorptionsmaximum von lichtadaptiertem BR befindet sich bei einer Wellenlänge von 568 nm. Für die BR-Mutanten D85T ergeben sich verschiedene Absorptionsspektren. Die spektrale Position und die spektrale Form des Absorptionsspektrums hängen davon ab, welcher pH-Wert eingestellt ist und welche Salzkonzentration vorliegt [146]. Die Absorptionsspektren der drei Proben D85T1 (pH=8.0, ohne Salz), D85T2 (pH=8.0, Salzkonzentration von 1 M NaCl), D85T3 (pH=6.0, ohne Salz) zeigen ein identisches spektrales Verhalten im roten Spektralbereich mit einem Absorptionsmaximum bei

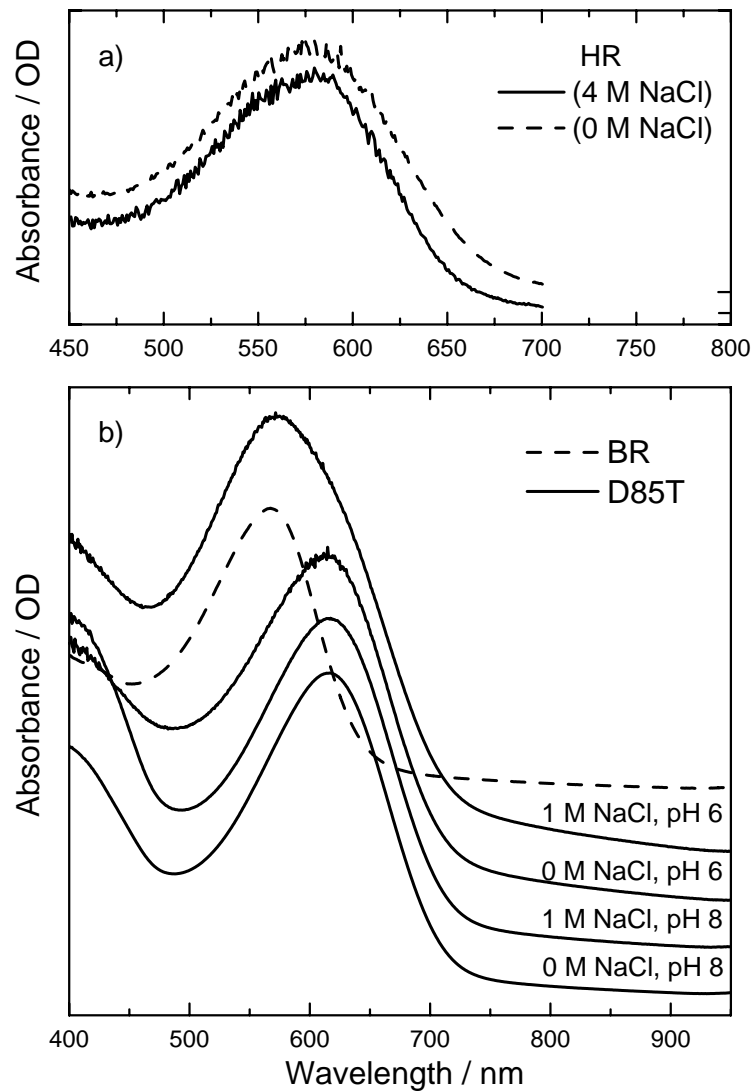


Abbildung 4.1: Stationäre Absorptionsspektren im sichtbaren Spektralbereich von a) Halorhodopsin mit einer Salzkonzentration von 4 M NaCl (durchgezogene Linie) und 0 M NaCl (gestrichelte Linie) sowie b) der Mutante D85T in vier verschiedenen Präparationszuständen, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Salzkonzentration unterscheiden: D85T1 (pH=8.0, ohne Salz), D85T2 (pH=8.0, Salzkonzentration von 1 M NaCl), D85T3 (pH=6.0, ohne Salz) und D85T4 (pH=6.0, Salzkonzentration von 1 M NaCl). Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum von Bakteriorhodopsin (BR) (gestrichelte Linie) eingezeichnet. Bei den Absorptionsspektren wurde jeweils ein konstanter Streuuntergrund subtrahiert, um die genaue Nulllinie anzugeben.

615 nm. Lediglich in einem Spektralbereich unterhalb von 500 nm unterscheiden sich die drei Proben D85T1, D85T2 und D85T3 in ihrem Absorptionsspektrum. Dies ist auf die verschiedenen Streueigenschaften der einzelnen Proben zurückzuführen. Die Probe D85T4 (pH=6.0, Salzkonzentration von 1 M NaCl) weicht in ihrem spektralen Verhalten von den anderen drei Proben ab, da sie über ein wesentlich breiteres Absorptionsspektrum verfügt, das eine ausgeprägte Schulter bei einer Wellenlänge von 615 nm aufweist. Ihr Absorptionsmaximum ist gegenüber den anderen drei Proben der BR-Mutante D85T hypsochrom verschoben und befindet sich bei einer Wellenlänge von 570 nm analog zum Absorptionsmaximum von lichtadaptiertem BR.

4.2 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich

Die Ergebnisse der zeitaufgelösten transienten Absorptionsspektroskopie auf der Femto- und Pikosekundenzeitskala an BR, HR und den vier Proben der BR-Mutante D85T werden im folgenden vorgestellt und diskutiert.

4.2.1 Ergebnisse

Bakteriorhodopsin

In Abb. 4.2 sind die transienten Absorptionsspektren für BR im sichtbaren Spektralbereich bis zu einer Nanosekunde dargestellt. Die Absorptionsänderung ist in Abhängigkeit von der Wellenlänge mit linearer und von der Verzögerungszeit mit linear-logarithmischer Achse aufgetragen. Direkt nach der Anregung mit einem Laserimpuls ($\lambda = 570$ nm) entsteht ein transientes Absorptionssignal (Ausbleichen) mit einem Maximum bei etwa 570 nm. Im blauen Spektralbereich kann die Absorption des angeregten Zustandes (ESA) mit einem Maximum bei ca. 470 nm beobachtet werden. Der angeregte Zustand weist eine Dynamik mit einem biphasischen Verhalten auf und zerfällt mit den zwei Zeitkonstanten von $\tau_1=80$ fs und $\tau_2=400$ fs. An den Zerfall des angeregten Zustandes schließt sich der Aufbau einer Absorptionsbande an, die bei einer Wellenlänge von 660 nm rotverschoben erscheint. Diese Absorptionsbande ergibt sich durch die Entstehung des kurzlebigen J-Intermediats, das innerhalb von 400 fs populiert wird. Mit einer Zeitkonstante von 3 ps findet der Zerfall des J-Intermediats statt, mit dem gleichzeitig der Übergang zum K-Intermediat erfolgt. Die Besetzung des K-Intermediats ist durch den Aufbau einer Absorption im roten Spektralbereich mit einem Absorptionsmaximum bei 630 nm charakterisiert. Eine Anpassung der Daten mit Hilfe eines Ratenmodells liefert vier Zeitkonstanten: $\tau_1=80$ fs, $\tau_2=400$ fs, $\tau_3=3$ ps und einen Offset ($\tau_4=\infty$) mit einem Maximum bei ca. 630 nm, das das bevölkerte K-Intermediat kennzeichnet. Die ermittelten Zeitkonstanten für alle untersuchten Retinalproteine sind zur Übersicht in Tabelle 4.1 am Ende der Ergebnisse zusammengefasst.

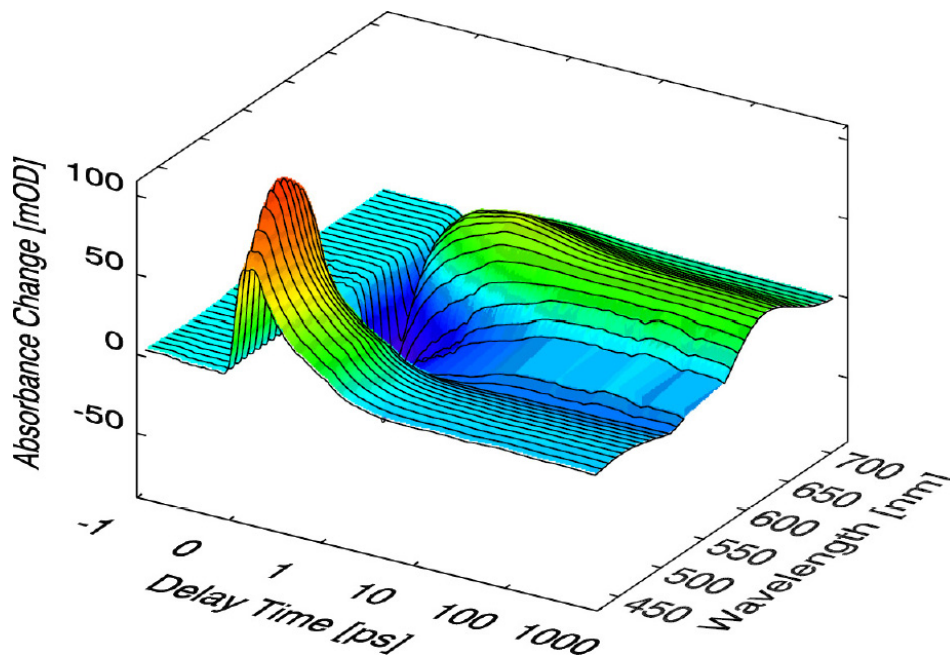


Abbildung 4.2: Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektren von BR. Die Absorptionsänderung ist in Abhängigkeit von der Wellenlänge mit linearer und von der Verzögerungszeit mit linear-logarithmischer Achse abgebildet.

Halorhodopsin

Um den Einfluss der Proteinumgebung auf die Isomerisierungsreaktion unter identischen Bedingungen zu bestimmen, ist es sehr wichtig, HR analog zu BR unter physiologischen Bedingungen in Membran eingebettet zu untersuchen. Daher wurde die Primärreaktion von HR in Membran eingebettet bei einer hochmolaren Salzkonzentration charakterisiert. In der Literatur war die Primärreaktion von HR bisher nur unter nicht-physiologischen Bedingungen, d. h. ohne Salz oder nicht ausreichender Salzkonzentration (< 0.5 M NaCl), beschrieben worden. Die hier vorgestellten transienten Absorptionmessungen beschreiben zum ersten Mal die Primärreaktion von HR unter physiologischen sowie nativen Bedingungen mit einer nahezu gesättigten Salzkonzentration von 4 M NaCl.

In Abb. 4.3 sind die zeitaufgelösten transienten Absorptionsspektren von HR ohne Salz a) und bei hoher Salzkonzentration b) in dreidimensionaler Darstellung angegeben. Direkt nach der lichtinduzierten Anregung mit einem Laserimpuls ($\lambda = 575$ nm) wird ein transientes Absorptionssignal (Ausbleichen) mit einem Maximum bei 570 nm gebildet. Ferner lassen sich im transienten Absorptionssignal die stimulierte Emission und die ESA beobachten. Die stimulierte Emission äußert sich in einer negativen Absorptionsänderung und tritt im roten Spektralbereich ($\lambda = 650$ nm) auf. Im blauen Spektralbereich erscheint die ESA als positive Absorptionsänderung bei Wellenlängen um 470 nm. Beide Signale (die stimulierte Emission und

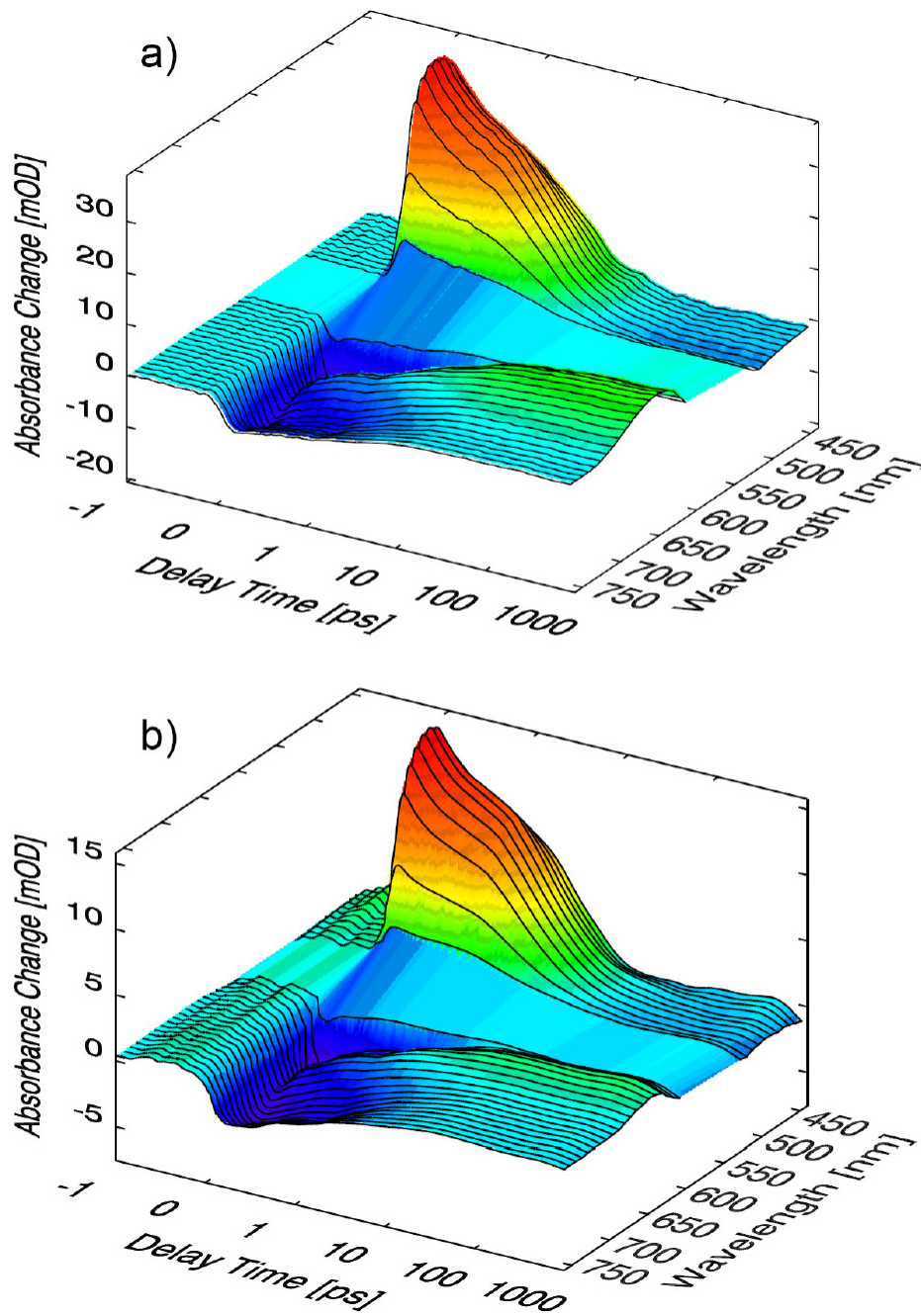


Abbildung 4.3: Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektren von HR. Die Absorptionsänderung ist als Funktion der Verzögerungszeit mit linear-logarithmischer und der Wellenlänge mit linearer Achse dargestellt:

a) HR ohne Salz

b) HR mit einer hochmolaren Salzkonzentration von 4 M NaCl.

die ESA) weisen eine biphasische Zerfallskinetik auf der Pikosekundenzeitskala auf. Für Verzögerungszeiten größer als 10 ps verbleibt ein konstantes Differenzspektrum im Wellenlängenbereich um 650 nm, das auf der Entstehung des isomerisierten Photoprodukts, das ein 13-*cis* Retinal enthält, beruht. Vergleicht man die zeitaufgelöste transiente Absorption beider HR-Proben (HR ohne Salz und HR mit Salz) miteinander, so ergeben sich sehr ähnliche zeitaufgelöste Absorptionsspektren, die innerhalb der Messgenauigkeit identisch aussehen. Der Unterschied der beiden HR-Proben bezüglich der Salzkonzentration, von 4 M NaCl, wie sie in der nativen Umgebung der Halobakterien vorliegt, gegenüber 0 M NaCl, hat keinen messbaren Einfluss auf das transiente Absorptionssignal im Zeitbereich von Femto- und Pikosekunden. Beide HR-Proben weisen auf dieser Zeitskala unabhängig von der vorhandenen Salzkonzentration die gleiche Dynamik auf.

Die Messdaten von HR ohne Salz verfügen über ein etwas besseres Signal-zu-Rausch-

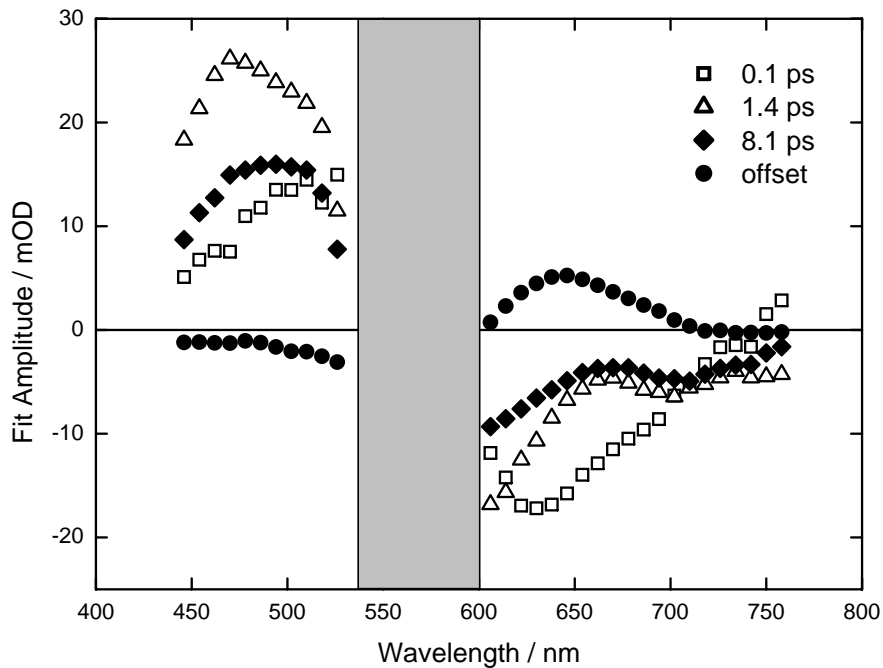


Abbildung 4.4: Amplitudenspektren von HR ohne Salz für die Zeitkonstanten von 0.1 ps (□), 1.4 ps (Δ), 8.1 ps (◆) und das Differenzspektrum (Offset) (●). Die Amplitudenspektren für HR mit Salz sehen innerhalb der Messgenauigkeit identisch zu den Amplitudenspektren von HR ohne Salz aus. Der graue Bereich um 575 nm deutet die spektrale Breite des Anregungsimpulses an.

Verhältnis aufgrund des geringeren Streuuntergrunds dieser Probe. Daher werden im folgenden exemplarisch für beide HR-Proben nur die Messungen von HR ohne Salz

diskutiert. Die Datenanpassung und Datenanalyse der Messungen an HR mit hoher Salzkonzentration ergeben sehr ähnliche Zeitkonstanten (ca. 0.1 ps, 1-1.5 ps und 5-8 ps) sowie sehr ähnliche Spektren (vgl. dazu die Zeitkonstanten der beiden HR-Proben in der Tabelle 4.1).

In Abb. 4.4 sind die Amplitudenspektren für HR ohne Salz für die Zeitkonstanten von 0.1 ps, 1.4 ps und 8.1 ps sowie das verbleibende Differenzspektrum bei 1 ns dargestellt. Der grau unterlegte Wellenlängenbereich deutet die spektrale Breite des verwendeten Anregungsimpulses an. Im Spektralbereich zwischen 440 nm und 530 nm wird die ESA beobachtet, deren dynamisches Verhalten durch die drei Zeitkonstanten von 0.1 ps, 1.4 ps und 8.1 ps gekennzeichnet ist. Der rote Spektralbereich zwischen 600 nm und 760 nm gibt im wesentlichen die stimulierte Emission wieder, die mit den gleichen drei Zeitkonstanten von 0.1 ps, 1.4 ps und 8.1 ps charakterisiert werden kann. Über den gesamten sichtbaren Spektralbereich erstreckt sich zu Verzögerungszeiten größer als 10 ps ein Differenzspektrum, das in dem gemessenen Zeitbereich bis zu 1 ns konstant bleibt. Das Differenzspektrum zeigt ein Maximum um 650 nm und entspricht einem Photoprodukt, das ein 13-*cis* Retinal enthält.

BR-Mutante D85T

An allen vier Proben der BR-Mutante D85T (D85T1, D85T2, D85T3 und D85T4) wurde zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt. Dazu wurde analog zu BR und HR die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit und der Wellenlänge bestimmt. Zur besseren Visualisierung wurde auf die dreidimensionale Darstellung der Messdaten für die Proben der BR-Mutante D85T verzichtet, die qualitativ eine ähnliche transiente Absorption wie die beiden HR-Proben zeigen. Stattdessen wurde das transiente Absorptionssignal als Funktion der Verzögerungszeit bei zwei charakteristischen Wellenlängen ausgewählt (Abb. 4.5) sowie die ermittelten Amplitudenspektren in Abb. 4.6 abgebildet.

Die drei Proben D85T1, D85T2 und D85T3, deren stationäre Absorptionsspektren einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen, verhalten sich auch in den zeitaufgelösten transienten Absorptionsmessungen praktisch identisch. Nur bei der Probe D85T4 fallen signifikante Unterschiede in der Ultrakurzzeitdynamik auf der Femto- und Pikosekundenzeitskala auf.

Die zugrundeliegenden Kinetiken für D85T1, D85T2 und D85T3 können durch einen multiexponentiellen Zerfall mit drei Zeitkonstanten und einem Offset angepasst werden. Der Offset kennzeichnet das verbleibende Photoprodukt mit einem isomerisierten Retinal. Als Zeitkonstanten ergeben sich folgende drei Zerfallszeiten: ~ 0.1 ps, ~ 3 ps und ~ 12 ps (vgl. Tabelle 4.1). Im folgenden werden nur die Eigenschaften der Probe D85T3 beschrieben und näher diskutiert, da die Probe D85T3 das gleiche zeitliche sowie spektrale Verhalten wie die beiden Proben D85T1 und D85T2 zeigt. Die Datenanpassung der transienten Absorption für die Probe D85T4 liefert wiederum die drei Zeitkonstanten von ~ 0.1 ps, ~ 3 ps und ~ 12 ps. Zusätzlich aber ergibt

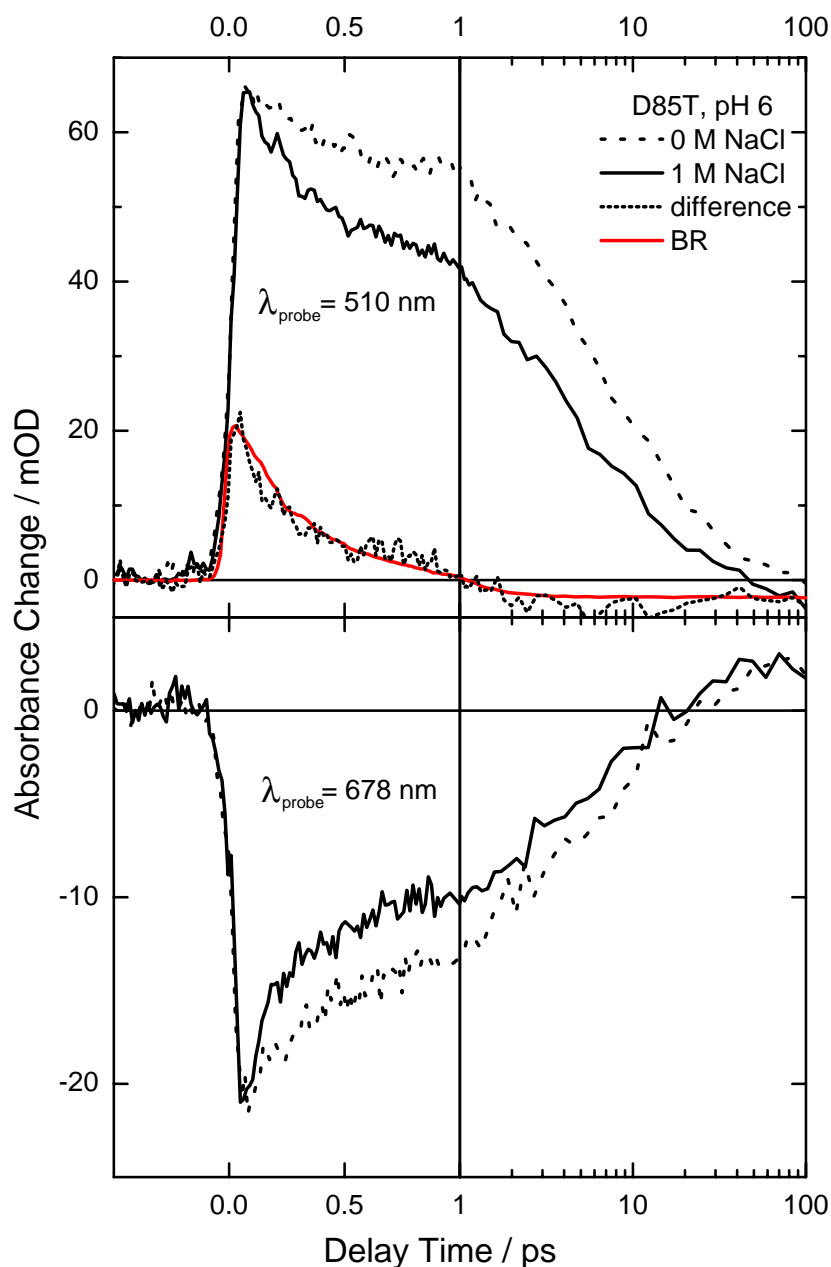


Abbildung 4.5: Vergleich des transienten Absorptionssignals $A(t)$ für die Proben D85T3 (0 M NaCl) und D85T4 (1 M NaCl), das in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit mit einer linear-logarithmischen Zeitachse abgebildet ist. Die Transienten sind für zwei Spektralbereiche exemplarisch bei einer Wellenlänge von 510 nm und bei 678 nm ausgewählt. Die gepunktete Linie gibt die Differenz wieder, die nach der Gleichung $(A(\text{D85T4}) - 0.75 \times A(\text{D85T3}))$ ermittelt wurde. Zum Vergleich ist die Transiente von BR rot eingezeichnet, die mit einem Faktor von 0.25 skaliert wurde.

sich in der Datenanpassung eine weitere Zeitkonstante von 0.5 ps (vgl. Tabelle 4.1). Diese zusätzliche kurze Zeitkonstante von 0.5 ps ist im spektralen Bereich der induzierten Absorption um 500 nm und in der stimulierten Emission um 700 nm deutlich sichtbar. Exemplarisch ist in Abb. 4.5 das transiente Absorptionssignal für zwei Abtastwellenlängen bei 510 nm (Bereich der ESA) und 678 nm (Bereich der stimulierten Emission) abgebildet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Transiente der Probe D85T3 und die durchgezogene Linie die Transiente der Probe D85T4. Beide Proben D85T3 und D85T4 wurden so präpariert, dass die gleiche Anzahl von Molekülen angeregt wurde. Um den Zeitnullpunkt stellt sich für die Proben das gleiche transiente Absorptionssignal ein. Vergleicht man die Transienten für die Proben D85T3 und D85T4 bei einer Abtastwellenlänge von 510 nm, so zeigen die Transienten zu Verzögerungszeiten größer als 1 ps -abgesehen von einem verbleibenden negativen Offset- für die Probe D85T4 dieselbe Dynamik. Für Verzögerungszeiten unter 1 ps unterscheiden sich dagegen die beiden Transienten, da im transienten Absorptionssignal der Probe D85T4 zusätzlich eine Zeitkonstante von 0.5 ps auftritt.

Um die Unterschiede in den beiden Transienten genauer herauszuarbeiten und zu quantifizieren, wird im folgenden eine Differenz-Betrachtung durchgeführt:

Das beobachtete Zeitverhalten für die Probe D85T4 legt nahe, dass das transiente Absorptionssignal sich aus zwei verschiedenen Anteilen zusammensetzt: einerseits aus einem BR-ähnlichen Anteil, der durch die Zeitkomponente von 0.5 ps charakterisiert ist, und andererseits aus einem Anteil, der durch die Dynamik der drei ähnlichen Proben D85T1, D85T2 und D85T3 gekennzeichnet ist. Um den Anteil zu eliminieren, der von der Probe D85T3 stammt, muss vorher der genaue Anteil dieser Probe am Zeitnullpunkt bestimmt werden. Durch einen Vergleich der Signale ergibt sich das folgende Verhältnis der beiden Anteile, die zum transienten Absorptionssignal der Probe D85T4 beitragen: Ein Anteil von 75 % aller D85T4-Moleküle weist die Dynamik der Probe D85T3 auf, während 25 % aller D85T4-Moleküle eine 0.5 ps Zeitkomponente enthalten, die sich BR-ähnlich verhalten. Wird nun das transiente Absorptionssignal der Probe D85T3 mit einem Skalierungsfaktor von 0.75 vom transienten Absorptionssignal der Probe D85T4 subtrahiert, erhält man den reinen Anteil von 25 %, der für das BR-ähnliche Verhalten der Probe D85T4 verantwortlich ist. Die so ermittelte Differenz, die den BR-ähnlichen Anteil der Probe D85T4 wiedergibt, ist in Abb. 4.5 als gepunktete Linie bei der Abtastwellenlänge von 510 nm eingezeichnet. Die Differenz zeigt ein rein monoexponentielles Verhalten, das mit einer Zeitkonstante von 0.5 ps zerfällt. Zum Vergleich dient in Abb. 4.5 eine Transiente von BR, die mit einem Faktor von 0.25 skaliert wurde, da nur ein Anteil von 25 % der Moleküle in der Probe D85T4 über eine schnelle Zeitkomponente von 0.5 ps verfügt. Der zeitliche Verlauf der beiden Transienten (BR und der Differenz) stimmt sehr gut überein.

Im Zerfall der stimulierten Emission bei einer Abtastwellenlänge von 678 nm kann eine ähnliche Beobachtung gemacht werden. Auch hier verhalten sich die beiden Transienten für Verzögerungszeiten größer als 1 ps gleich. Im vorderen Zeitbereich für Verzögerungszeiten unter 1 ps ergeben sich Unterschiede, da das transiente Absorp-

tionssignal bei der Probe D85T4 mit der zusätzlichen BR-ähnlichen Zeitkonstante von 0.5 ps zerfällt.

In Abb. 4.6 werden die Amplitudenspektren von den Proben D85T3 und D85T4 ge-

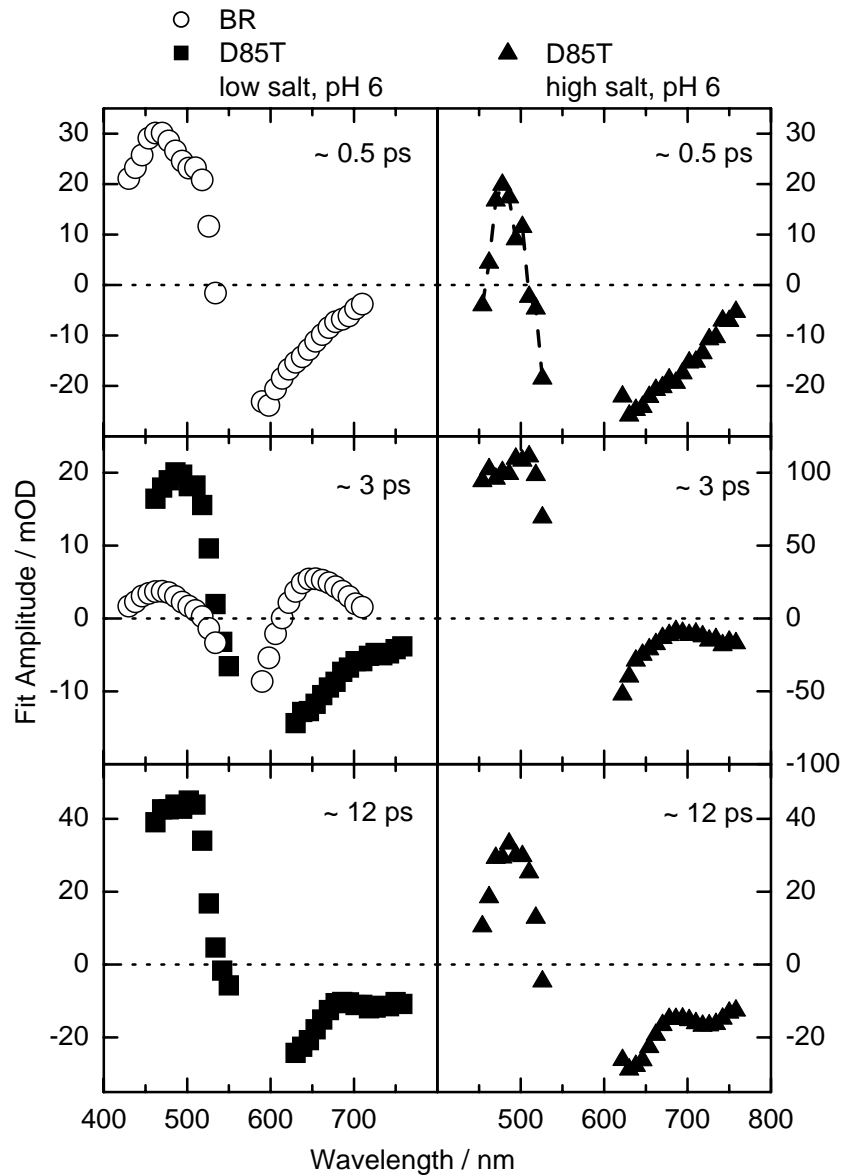


Abbildung 4.6: Amplitudenspektren von BR (○), D85T3 (low salt, pH 6) (■) und D85T4 (high salt, pH 6) (▲). Links sind die Amplitudenspektren von BR mit der Zeitkonstante von 0.5 ps und von D85T3 im Vergleich mit der Probe D85T4 abgebildet. Das Amplitudenspektrum von BR wurde mit einem Faktor von 0.25 skaliert.

genübergestellt. In Abb. 4.6 (rechts) sind die Amplitudenspektren der Probe D85T4 (▲) mit den Zeitkonstanten 0.5 ps, 3 ps und 12 ps dargestellt, die durch eine Daten-

anpassung mit Hilfe eines Ratenmodells ermittelt wurden. In Abb. 4.6 (links) sind die Amplitudenspektren der Probe D85T3 (■) für die beiden Zeitkonstanten von 3 ps und 12 ps abgebildet. Zum Vergleich sind die Amplitudenspektren von BR (○), das als Referenz dient, gezeigt (Zeitkonstanten von 0.5 ps und 3 ps). In der Darstellung wurden die Amplitudenspektren von BR mit einem Faktor 0.25 skaliert, um dem 25 %-tigen Anteil der D85T4-Moleküle mit einer BR-ähnlichen Kinetik Rechnung zu tragen. Die Amplitudenspektren für die Zeitkonstante 0.5 ps von BR und D85T4 besitzen einen ähnlichen spektralen Verlauf. Vergleicht man die Amplitudenspektren der Proben D85T3 und D85T4 für jeweils die Zeitkonstanten ~ 3 ps und ~ 12 ps miteinander, so lässt sich ebenfalls ein ähnliches spektrales Verhalten feststellen. Nur für die Zeitkonstante von ~ 3 ps ergibt sich ein gewisser Unterschied im roten Spektralbereich zwischen 600 nm und 750 nm im Amplitudenspektrum beider Proben D85T3 und D85T4. Allerdings kann für die Zeitkonstante von ~ 3 ps eine Addition der beiden Amplitudenspektren von BR und der Probe D85T3 das dazugehörige Amplitudenspektrum von D85T4 reproduzieren. Eine weitere Diskussion der drei Zeitkonstanten wird im nächsten Abschnitt gegeben.

Probe	pH-Wert	Salz-konzentration	τ_1 [ps]	τ_2 [ps]	τ_3 [ps]	τ_4 [ps]	τ_5
BR	7.5	150 mM KCl	0.08	0.4	3.2	—	∞
HR ohne Salz	7.5	0 M NaCl	0.11	—	1.4	8.1	∞
HR mit Salz	7.5	4 M NaCl	0.1	—	1.0	5.2	∞
D85T1	8.0	0 M NaCl	0.1	—	3.1	14.9	∞
D85T2	8.0	1 M NaCl	0.07	—	2.4	11.9	∞
D85T3	6.0	0 M NaCl	0.09	—	2.5	12.6	∞
D85T4	6.0	1 M NaCl	0.18	0.5	4.0	16.8	∞

Tabelle 4.1: Übersicht der untersuchten Proben, für die jeweils der pH-Wert und die Salzkonzentration angegeben ist. Ferner sind die ermittelten Zeitkonstanten, die eine Datenanpassung mit einem Ratenmodell ergab, angeführt.

4.2.2 Diskussion

Halorhodopsin

In HR stellt der Chloridtransport unter physiologischen Bedingungen, d. h. unter sehr hohen Salzkonzentrationen, einen zyklischen Prozess mit mehreren Intermediaten dar [202], der durch die lichtinduzierte Photoisomerisierung des Retinals initiiert wird. In den transienten Absorptionmessungen erzielt die Variation der Salzkonzentration in HR keinen wahrnehmbaren Effekt auf die Primärreaktion im Femto- und Pikosekundenbereich. In beiden Fällen, HR mit Salz und HR ohne Salz, ergeben sich innerhalb der Messgenauigkeit die gleichen Zerfallskinetiken von ~ 0.1 ps, ~ 1.0 ps und $\sim 5-8$ ps,

die sehr gut mit den Ergebnissen in der Literatur übereinstimmen [238, 240, 247]. Die Unabhängigkeit der Primärdynamik von der umgebenden Salzkonzentration stellt allerdings ein neues und unerwartetes Ergebnis dar, da die Gesamtfunktion von HR als Chloridionenpumpe wesentlich von der vorhandenen Salzkonzentration abhängt. In Anbetracht der Tatsache, dass die Besetzung der Chloridbindungsstelle, die als Donor für den Transport fungiert, von der Salzkonzentration in der Lösung abhängt, ist es überraschend, dass die Besetzung der Chloridionenbindungsstelle in den transienten Absorptionsmessungen keinen Einfluss auf die Primärdynamik von HR ausübt. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch die stationären Absorptionsmessungen ergänzt. In der stationären Absorption lässt sich ebenfalls kein Effekt auf die spektrale Position oder die spektrale Form des Absorptionsspektrums beobachten, der auf die Salzkonzentration zurückzuführen ist. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die photophysikalischen Prozesse des Retinals (Absorption und Isomerisation) unabhängig von der Gegenwart eines Chloridanions an der primären Donorstelle sind. Die Besetzung der primären Chloridbindungsstelle spielt nur für die späteren Schritte im Photozyklus eine wichtige Rolle. Die initiale Dynamik der Isomerisierungsreaktion in HR ist daher unabhängig von dem von ihr induzierten Ionentransport [145, 146].

Mutante D85T

Die experimentellen Ergebnisse aus den transienten Absorptionsmessungen an den Proben D85T zeigen, dass eine hohe Salzkonzentration in Kombination mit einem pH-Wert unter 7 (D85T4) sowohl die Eigenschaften des stationären Absorptionsspektrums als auch die primären photochemischen Prozesse des Retinals auf der Femto- und Pikosekundenzeitskala verändern kann.

Stationäre Absorptionsspektroskopie liefert für die drei Proben D85T1, D85T2 und D85T3 identische Absorptionsspektren. Nur für die Probe D85T4 ergibt sich im stationären Absorptionsspektrum eine große hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 570 nm (wie bei lichtadaptiertem BR). Da die Elektrostatik in der Umgebung der Schiffschens Base und des Retinals wesentlich das stationäre Absorptionsspektrum beeinflusst, kann daraus die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die experimentellen Bedingungen bezüglich pH-Wert und Salzkonzentration für die Probe D85T4 eine ähnliche Elektrostatik in der Umgebung des Retinals wie in BR erzeugen. Die spektrale Verschiebung des Absorptionsmaximums von 615 nm (D85T1, D85T2, D85T3) um mehr als 40 nm deutet darauf hin, dass in der Probe D85T4 ein Chloridion in der Nähe der Schiffschens Base gebunden ist. Diese Bedingung tritt allerdings nur für pH-Werte unterhalb von 7 bei ausreichender Salzkonzentration auf. Die Bindung von Halogenidionen in der Nähe der Schiffschens Base konnte durch Röntgenstrukturanalyse an der Mutante D85S nachgewiesen werden [271]. Die große strukturelle Ähnlichkeit der beiden Mutanten D85S und D85T zusammen mit den hier präsentierten Messungen bestätigen die Annahme, dass unter den experimentellen Bedingungen für die Probe D85T4 (pH=6.0, 1 M NaCl) ein Chloridion in der Nähe der Schiffschens Base des Retinals gebunden wird.

Vergleich der Mutante D85T mit HR und BR

Es folgt nun eine Analyse der zeitaufgelösten transienten Absorptionsexperimente in Bezug auf die Dynamik der Isomerisierung des Retinals.

Alle vier Proben (D85T1, D85T2, D85T3, D85T4) zeigen eine biexponentielle Dynamik im angeregten Zustand mit den Zeitkonstanten von ~ 3 ps und ~ 12 ps. Diese beiden Zeitkonstanten stimmen sehr gut mit Ergebnissen zu zeitaufgelösten Absorptionsexperimenten an der Mutante D85N, die strukturell eine sehr große Ähnlichkeit mit der Mutanten D85T hat, überein [22, 265]. Ein ähnliches biexponentielles Verhalten wird in der Primärdynamik von HR beobachtet, die durch eine etwas schnellere Zerfallskinetik bestehend aus den beiden Zeitkonstanten von 1.5 ps und 8.5 ps charakterisiert ist (vgl. Tabelle 4.1). Vergleicht man die Primärdynamik der Proben D85T1, D85T2 und D85T3 mit HR, so ergeben sich sehr gute und weitreichende Übereinstimmungen hinsichtlich der biexponentiellen Zerfallskinetik und den Amplitudenspektren. Folglich ist die strukturelle sowie die elektrostatische Umgebung in der Nähe der Schiffchen Base des Retinals für die Proben D85T1, D85T2, D85T3 und HR ähnlich. Insgesamt weist HR eine etwas schnellere Primärdynamik (um einen Faktor 2) im Femto- und Pikosekundenbereich auf als die Mutante D85T. Dies kann auf verbleibende Unterschiede in der strukturellen und elektrostatischen Umgebung zwischen HR und der Mutante D85T zurückgeführt werden. Für die Mutation D85T wurde nur eine einzige Aminosäure an BR ausgetauscht. Diese Mutation an BR verursacht eine HR-ähnliche Primärdynamik, die einen Anionentransport induzieren kann. Im Vergleich dazu besitzt HR hingegen eine Primärstruktur, die an vielen Stellen von der Struktur von BR abweicht (Homologie von ca. 30 %) [64, 65, 211]. Außerdem wurde HR im Gegensatz zur Probe D85T4 durch die Evolution optimiert, unter nativen Bedingungen Anionen zu transportieren.

Das stationäre Absorptionsspektrum der Probe D85T4 zeigt Anzeichen für eine starke Inhomogenität (Abb. 4.1 und Abb. 4.7). Das Maximum der stationären Absorption befindet sich bei einer Wellenlänge von 570 nm, bei der spektral auch das stationäre Absorptionsmaximum von lichtadaptiertem BR liegt. Diese Bande ist jedoch spektral wesentlich breiter als bei anderen Retinalproteinen (BR und HR). Ferner verbleibt eine ausgeprägte Schulter bei einer Wellenlänge von 615 nm (Abb. 4.1), die spektral beim bekannten Absorptionsmaximum der drei Proben D85T1, D85T2 und D85T3 liegt. Das ausgedehnte stationäre Absorptionsspektrum der Probe D85T4 kann reproduziert werden, indem die beiden stationären Absorptionsspektren der Probe D85T3 und BR geeignet skaliert und anschließend addiert werden (Abb. 4.7). Die Addition der skalierten stationären Absorptionsspektren von D85T3 und BR ergibt den spektralen Verlauf des stationären Absorptionsspektrums von D85T4 (gestrichelte Linie in Abb. 4.7). Dabei tragen die stationären Absorptionsspektren von D85T3 und BR jeweils mit einem Anteil von 70 % bzw. 30 % zum stationären Absorptionsspektrum der Probe D85T4 bei. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass unter hohen Salzkonzentrationen und einem niedrigen pH-Wert, wie es für die Probe D85T4 realisiert ist, elektrostatische Bedingungen ähnlich zu BR geschaffen werden können. Diese

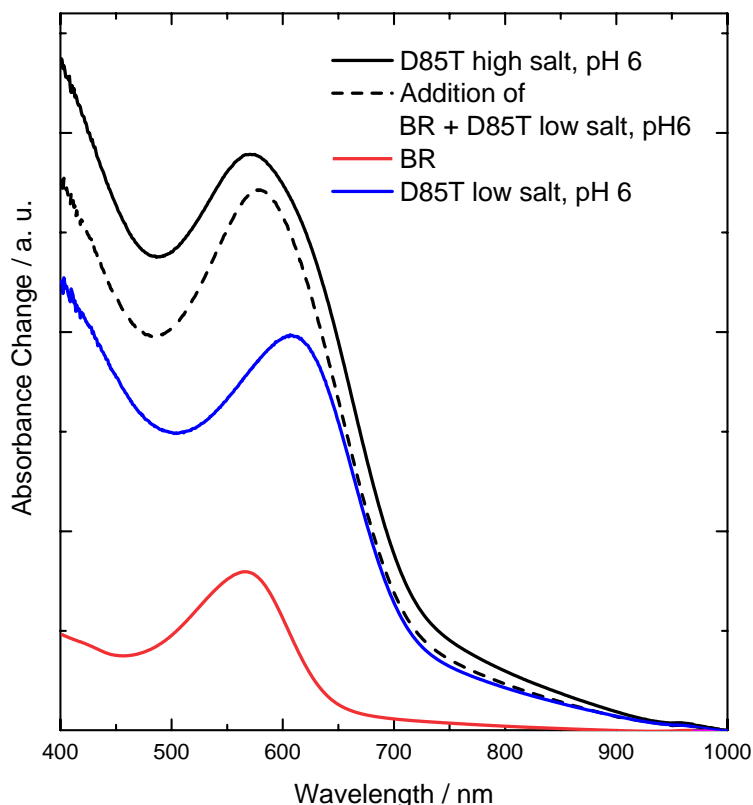


Abbildung 4.7: Stationäre Absorptionsspektren von BR, D85T3 (low salt, pH 6) und D85T4 (high salt, pH 6). Durch eine geeignete Skalierung der beiden stationären Absorptionsspektren von BR (30 %) und der Proben D85T3 (70 %) kann eine Addition der beiden Absorptionsspektren das Absorptionsspektrum von D85T4 reproduzieren. Bei den Absorptionsspektren wurde jeweils ein konstanter Streuuntergrund subtrahiert, bevor sie geeignet skaliert wurden.

BR-ähnlichen Bedingungen, die die Elektrostatik in der Umgebung der Schiffsbasis betreffen, gelten für ca. 25 % aller D85T4-Moleküle. Daher vereinigt die Probe D85T4 Merkmale, die einerseits für die Proben D85T1, D85T2 und D85T3 und andererseits für BR charakteristisch sind.

Diese Kombination von Eigenschaften, die von den Proben D85T1, D85T2 und D85T3 und von BR stammen und in der stationären Absorption auftreten, äußert sich auch in der zeitaufgelösten Absorption der Probe D85T4. Die zeitaufgelöste transiente Absorption der Probe D85T4 ist ebenso über einen biphasischen Zerfall des angeregten Zustandes mit den Zeitkonstanten von ~ 3 ps und ~ 12 ps wie die Proben D85T1, D85T2 und D85T3 gekennzeichnet. Zusätzlich findet in der zeitaufgelösten transienten Absorption ein Zerfall der Population im angeregten Zustand mit einer Zeitkonstante von 0.5 ps statt, der auf die Ladung in der Nähe der Schiffsbasis zurückzuführen ist. Die Zeitkonstante von 0.5 ps ist als Zerfallskinetik des angeregten

Zustandes von BR bekannt. Offensichtlich führt ein niedriger pH-Wert zusammen mit einer hohen Salzkonzentration (Probe D85T4) dazu, dass für einen gewissen Anteil (25 %) der Moleküle eine strukturelle und elektrostatische Umgebung in der Nähe der Schiffischen Base des Retinals geschaffen wird, die der Umgebung von BR entspricht.

Nur die Probe D85T4 führt einen aktiven Transportzyklus durch, der mit einem Chloridtransport verbunden ist. Dieser aktive Transportzyklus wird über den reaktiven Kanal erreicht, der mit der Zeitkonstante von 0.5 ps charakterisiert ist. Dieser reaktive Kanal ist allerdings nur für 25 % der D85T4-Moleküle zugänglich. Die anderen beiden Reaktionskanäle, deren Dynamik mit den Zeitkonstanten ~ 3 ps und ~ 12 ps beschrieben wird, stellen Verlustkanäle dar, die kein Transportverhalten hervorrufen. Aufgrund der beobachteten Eigenschaften kann die Probe D85T4 als inhomogen betrachtet werden. Sie beinhaltet nämlich Moleküle mit einem Anteil von 75 %, die sich wie die Probe D85T3 verhalten, und zu 25 % Moleküle mit einem BR-ähnlichen Verhalten.

Erklärung der Inhomogenität in der Probe D85T4

Für die Inhomogenität, die in den stationären sowie zeitaufgelösten Absorptionsmessungen der Probe D85T4 beobachtet wurde, kommen als mögliche Ursachen in Frage:

1. eine Verteilung von Retinalisomeren (*all-trans*, *13-cis*, *9-cis*),
2. eine Verteilung von mehreren vorhandenen Anionenbindungsstellen sowie
3. die Flexibilität des gebundenen Chloridions.

Zu 1: Unter den hier vorliegenden experimentellen Bedingungen mit Anregungsimpulsen bei einer Wellenlänge von 580 nm, kann nur das Retinal in seiner *all-trans* Konfiguration effektiv angeregt werden, da Retinale mit einer *13-cis* und einer *9-cis* Konfiguration ein Absorptionsspektrum im blauen Spektralbereich mit einem Maximum um 460 nm aufweisen und kaum noch im Spektralbereich bei 580 nm absorbieren können [325]. Eine Verteilung von unterschiedlichen Retinalisomeren, die im Experiment angeregt werden, kann deshalb nicht zur Erklärung der beobachteten Inhomogenität der Reaktionsdynamik herangezogen werden.

Zu 2: In den Röntgenstrukturanalysen an der Mutante D85S [271] wurde nur eine einzige Anionenbindungsstelle in der Nähe der Schiffischen Base identifiziert, so dass eine Verteilung von Anionenbindungsstellen ebenfalls keine Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete Inhomogenität liefern kann.

Zu 3: Als wahrscheinlichste Ursache für die Inhomogenität verbleibt damit die Flexibilität des gebundenen Chloridions. Die negative Ladung in Form des gebundenen

Chloridions an der Position 85 ist in der Probe D85T4 nicht so fest gebunden wie die ursprüngliche Aminosäure Aspartat in BR. In den Kristallstrukturen für die Mutante D85S [271] existiert zwar nur eine einzige Anionenbindungsstelle, die in der Nähe der Schiffischen Base lokalisiert ist. Aus der experimentell bestimmten Elektronendichte an dieser Anionenbindungsstelle kann aber eine Subpopulation eines gebundenen Chloridions mit einer geringeren Elektronendichte von 25 %, die sich räumlich unmittelbar in der Nähe der eigentlichen Anionenbindungsstelle befindet, nicht ausgeschlossen werden. Experimente zur Anionenspezifität zeigen, dass das Chloridanion beim Bindungsprozess einen größeren Raum (hellgrüne Fläche in Abb. 4.8 unten) zur Verfügung hat [272]. Da das Chloridion eine kleinere Ausdehnung besitzt als das Bromidion, das in der Strukturanalyse in der Mutante D85S verwendet wurde, kann es die Flexibilität der Bindungsstelle ausnutzen, um andere Positionen einzunehmen. Aufgrund des geringeren Radius kann das Chloridion eine Position näher an der Schiffischen Base besetzen, so dass eine negative Ladung an ähnlicher Stelle wie in BR auftritt (Abb. 4.8 oben). Anders als in BR, bei dem die negative Ladung durch die Aminosäure Asp85 definiert und fest eingebaut ist, kann sich die negative Ladung in der Probe D85T4 über einen größeren Raumbereich verteilen. Aus den hier gewonnenen experimentellen Ergebnissen wird diese Situation nur für einen gewissen Anteil von ca. 25 % der D85T4-Moleküle erreicht, der für die ultraschnelle Isomerisierungsreaktion mit der BR-ähnlichen Zeitkonstante von 0.5 ps und für das BR-ähnliche Absorptionsspektrum verantwortlich ist. Damit bestimmt die exakte Position des Chloridions die lokale Elektrostatik und liefert eine Erklärung für die beobachtete Inhomogenität im stationären und zeitaufgelösten Absorptionsverhalten der Probe D85T4.

Die BR-ähnliche Zeitkomponente von 0.5 ps kann nur die Probe D85T4 aufweisen. In den Proben D85T1, D85T2 und D85T3 dagegen kann diese BR-ähnliche Zeitkomponente nicht auftreten. Aufgrund der Probenpräparation steht in den beiden Proben D85T1 (pH=8.0, kein Salz) und D85T3 (pH=6.0, kein Salz) gar kein Chloridion für die Bindung in die Nähe der Position 85 zur Verfügung, um die BR-ähnliche Primärreaktion mit einer Zeitkonstante von 0.5 ps erzeugen zu können. In der Probe D85T2 (pH=8.0, 1 M NaCl) ist zwar ein Chloridion für eine mögliche Bindung vorhanden, das aber aufgrund des eingestellten pH-Werts von 8.0 nicht in die Nähe der Position 85 binden kann. Ein Chloridion kann nur dann dort binden, wenn der pH-Wert in der Probe unterhalb des pK-Werts der Aminosäure Asp212 liegt. Für die Probe D85T2 liegt ein pH-Wert von 8.0 vor, der sich oberhalb des pK-Werts von 6.9 der Aminosäure Asp212 befindet [146], so dass keine Anionenbindung erfolgen kann.

Nur ein Anteil von ca. 25 % aller D85T4-Moleküle, für die eine elektrostatische Umgebung wie in BR entsteht, führt einen aktiven Photozyklus durch, der mit dem Transport eines Chloridions verbunden ist. Daher ergibt sich für die Probe D85T4 eine wesentlich geringere Quantenausbeute als in BR [146]. Die anderen drei Proben D85T1, D85T2 und D85T3 dagegen zeigen unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen kein Transportverhalten.

Interessanterweise ist D85T4 als einzige Probe in der Lage, Anionen zu transportie-

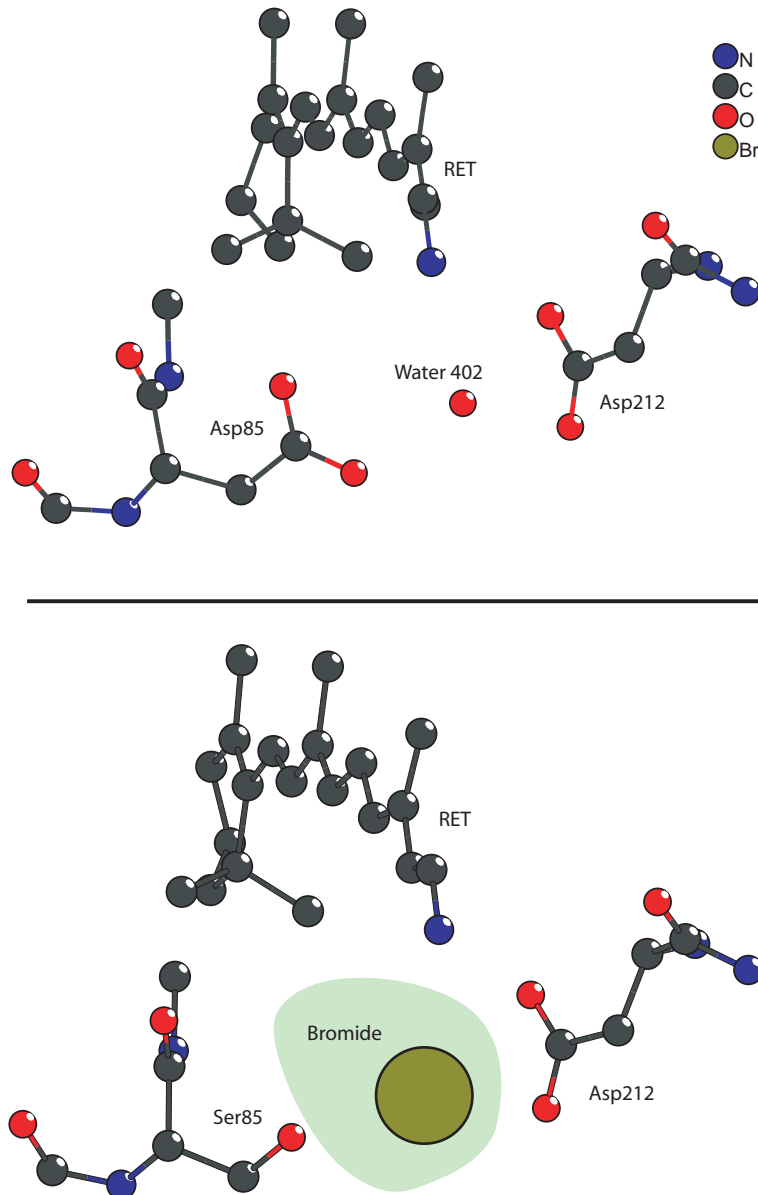


Abbildung 4.8: Strukturen in der Nähe des Retinals für BR (oben) und für die Mutante D85S (unten). Die Strukturinformationen wurden aus [69, 271] entnommen. In beiden Strukturen sind das Retinal (RET), die Aminosäuren Asp212 und Asp85 für BR bzw. Ser85 für die Mutante D85S dargestellt. In der Mutante D85S kann das Anion (Bromid) über einen größeren Bereich verteilt sein (hellgrüner Bereich) [271]. Nur wenn das Anion (Chloridion) in einem eingeschränkten Bereich (schematisch als dunkelgrüne Fläche gekennzeichnet) lokalisiert ist, kommt es nach den experimentellen Ergebnissen zu einer BR-ähnlichen Primärdynamik.

ren, auch bei Belichtung photochemisch stabil, wie die Extraktion des Retinals zeigt (vgl. Tabelle 4.2).

Retinalkonfiguration	D85T1	D85T2	D85T3	D85T4
lichtadaptiert				
<i>all-trans</i>	43	25	52	32
<i>13-cis</i>	32	37	37	65
<i>9-cis</i>	25	38 (44)	11	4
dunkeladaptiert				
<i>all-trans</i>	56	44	62	42
<i>13-cis</i>	43	55	38	57
<i>9-cis</i>	1	<1	1	1

Tabelle 4.2: Analyse der Retinalisomere in den vier Proben der Mutante D85T durch Extraktion [322]. Die dunkeladaptierten Proben wurden in den jeweiligen Puffern suspendiert und für 12 h bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Die Belichtung wurde für 10 min mit Wellenlängen $\lambda > 515$ nm durchgeführt. Der Wert in Klammern für die Probe D85T2 wurde nach einer Belichtung mit Wellenlängen $\lambda > 645$ nm bestimmt. Die ermittelten Werte bezeichnen den Anteil der Retinalkonfiguration in %. Die Anteile sind für den lichtadaptierten und den dunkeladaptierten Fall angegeben.

Ein Retinalprotein wird als photochemisch stabil bezeichnet, wenn eine kontinuierliche Belichtung keine Akkumulation des *9-cis* Retinals hervorruft, das zur photochemischen Inaktivierung der Probe führt. In einer stabilen Probe sind die Retinalisomere nur in den beiden Konfigurationen *all-trans* und *13-cis* vorhanden. Im dunkeladaptierten Zustand liegen in allen Proben die Retinalisomere ausschließlich in der *all-trans* bzw. *13-cis* Konfiguration vor. Wird eine kontinuierliche Belichtung der vier Proben vorgenommen, ändert sich das Verhältnis der enthaltenen Retinalisomere. In den drei Proben D85T1, D85T2 und D85T3, die keinen Ionentransport durchführen, kommt es nach kontinuierlicher Belichtung zu einer Akkumulation des *9-cis* Retinals. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Proben keine photochemische Stabilität besitzen. Die Probe D85T4 dagegen erfährt bei kontinuierlicher Belichtung keine wesentliche Akkumulation des *9-cis* Retinals und stellt damit als einzige der vier Proben eine photochemisch stabile Ionenpumpe dar.

Insgesamt kann aus den Experimenten die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Wiederherstellung der elektrostatischen Umgebung in der Nähe der Schiffchen Base in der Probe D85T4 durch geeigneten pH-Wert und hohe Chloridkonzentration wie in BR gelingt. Diese elektrostatische Umgebung analog zu BR erzeugt eine BR-ähnliche Primärdynamik im Femto- und Pikosekundenbereich. Somit hängt die Isomerisierungsreaktion nicht von den speziellen Eigenschaften des funktionellen Ionentransports ab, sondern nur von der Ladung und Geometrie des Gegenions in der Nähe der Schiffchen Base. Die exakte Position der Ladung spielt dabei eine essentielle Rolle und übt einen sensitiven Einfluss auf die Primärreaktion im Femto- und

Pikosekundenbereich aus [326].

Die Mutante D85T kann abhängig von den vorliegenden experimentellen Bedingungen ein BR- oder HR-ähnliches Verhalten zeigen. Nur wenn die negative Ladung exakt an der Stelle 85 lokalisiert ist, kommt es zu einer BR-ähnlichen stationären Absorption und zu einer schnellen Isomerisierungsreaktion wie in BR. Befindet sich dagegen die Ladung an einer Position, die außerhalb dieses eingeschränkten Bereichs liegt, kommt es zu einer HR-ähnlichen Primärdynamik mit einer biexponentiellen Zerfallskinetik.

Betrachtet man BR und seine biologische Bedeutung im Archaeon *Halobacterium salinarum*, so führt es die Funktion einer Protonenpumpe aus. BR ist durch die Evolution dafür optimiert, effizient Protonen zu transportieren. Im Vergleich zu BR stellt HR jedoch ein regulatorisches Protein dar, das den osmotischen Ausgleich während des Zellwachstums gewährleistet. Seine Funktion als Chloridionenpumpe im *Halobacterium salinarum* erfordert für diesen Prozess keine hohe Effizienz. Im Gegensatz zu BR weist HR eine geringere evolutionäre Optimierung als BR auf. In HR erfolgt nämlich eine lichtinduzierte Anregung in ein flaches breites Tal in der S_1 -Potentialfläche, deren Zerfall durch mehrere Zeitkonstanten gekennzeichnet ist. Dabei führt jedoch nur ein Kanal zur Anionenpumpaktivität [238]. Die geringere Effizienz von HR könnte folgendermaßen erklärt werden: Das Protein HR könnte aus einem frühen BR Protein entstanden sein, das noch nicht durch die Evolution optimiert war. Folglich würde HR die ursprüngliche Potentiallandschaft von einem frühen noch nicht optimierten BR verwenden, deren Potential zu einer biexponentiellen Kinetik führt. Im optimierten BR dagegen findet eine lichtinduzierte Anregung in einen Bereich der Potentialfläche statt, der in einen gut gerichteten schmalen Kanal mit einer schnellen Rate mündet und zu einer höheren Effizienz führt.

4.3 Zusammenfassende Bemerkung

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der Proteinumgebung und ihre Wechselwirkung mit dem Chromophor auf die photochemische Reaktion des Retinals untersucht. Für diese Fragestellung wurden zeitaufgelöste transiente Absorptionsexperimente im Femtosekundenbereich an BR, HR und der BR-Mutante D85T durchgeführt, die die Bewegungen auf der angeregten Potentialfläche S_1 beobachten. Dazu wurde erstmals in dieser Arbeit die Primärreaktion von HR unter nativen physiologischen Bedingungen, d. h. in Membran eingebettet mit einer gesättigten Salzkonzentration von 4 M NaCl, charakterisiert.

BR und HR verfügen zwar über eine große strukturelle Ähnlichkeit, unterscheiden sich aber wesentlich sowohl in ihrer Primärreaktion als auch in ihrer biologischen Funktion als Protonen- oder Chloridpumpe. Der wichtigste strukturelle Unterschied besteht in der Ladung der Aminosäure an der Position 85, die sich in der Nähe der Schiffischen Base des Retinals befindet (Aspartat in BR, Threonin in HR). Die Ladung beeinflusst das stationäre Absorptionsspektrum sowie die Dynamik der Iso-

merisierungsreaktion. Die BR-Mutante D85T erlaubt es durch Änderung des pH-Werts und der Salzkonzentration gezielt die Ladung an der Position 85 zu variieren. Die experimentellen Ergebnisse an der Mutante D85T zeigen, dass die Ladung und ihre exakte Position einen wesentlichen Einfluss auf die Primärreaktion im Femto- und Pikosekundenbereich ausübt. Nur wenn das Anion (Chloridion) in einem eingeschränkten Bereich lokalisiert ist, wird eine elektrostatische Umgebung in der Nähe der Schiffischen Base des Retinals erzeugt, die sowohl eine stationäre Absorption als auch eine schnelle Isomerisierung wie in BR hervorruft. Befindet sich das Anion dagegen außerhalb dieses eingeschränkten Bereichs, ergibt sich eine HR-ähnliche Primärdynamik mit einer biexponentiellen Kinetik.

5 Initiale Reaktionen in Bakteriorhodopsin

Ein elektronisch angeregter Zustand kann im sichtbaren Spektralbereich u. a. mit Hilfe von transienter Absorptionsspektroskopie und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Mit transienter Absorptionsspektroskopie können Prozesse im Grundzustand und im angeregten Zustand beobachtet werden. Zum Signal tragen das Grundzustandsausbleichen, die stimulierte Emission, die Absorption des angeregten Zustandes (ESA) sowie Produktbanden bei, deren Beiträge sich im Messsignal überlagern. Für Bakteriorhodopsin (BR) kommt es im Spektralbereich zwischen 650 nm und 850 nm zu einer solchen Überlagerung [160, 161, 181]. Daher ist die stimulierte Emission nicht eindeutig zu identifizieren, was eine Separation und Zuordnung der einzelnen Signalbeiträge in diesem Spektralbereich erschwert. Als geeignete Lösung bietet sich dafür die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie an, da sie den entscheidenden Vorteil besitzt, selektiv nur Signalbeiträge aus dem angeregten Zustand zu detektieren. Die beiden bisher durchgeführten zeitaufgelösten Up-Conversions-Fluoreszenzexperimente an BR [163, 164] kommen zwar zu ähnlichen Ergebnissen, jedoch treten erhebliche Unterschiede in der ultraschnellen Dynamik im Zeitbereich unterhalb 1 ps sowie in der Amplitude, die zur Zeitkonstante im Pikosekundenbereich gehört, auf.

Aufgrund dieser Diskrepanzen in der Literatur wurden zeitaufgelöste breitbandige Fluoreszenzexperimente, die auf der Kerr-Schalter-Technik basieren, unter wohldefinierten experimentellen Bedingungen hinsichtlich des Austauschs der Probe und der Anregungsdichten an BR durchgeführt. Dazu wurde das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Anregungsdichte untersucht. Die resultierenden Ergebnisse sind in der Lage, einige Diskrepanzen in der Literatur zu erklären. Zum Vergleich zu den zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie-Experimenten wurden Experimente an denselben BR Präparationen mit Hilfe sichtbarer transienter Absorptionsspektroskopie durchgeführt.

5.1 Fluoreszenzspektroskopie

Molekulare Systeme wie BR mit einer ultraschnellen photochemischen Reaktion zeigen in zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren erwartungsgemäß folgende drei allgemeine charakteristische Merkmale:

(i) Aufgrund einer gedämpften Bewegung auf der angeregten Potentialfläche verringert sich mit der Zeit der Energieabstand zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand. Dieser Prozess kennzeichnet einen dynamischen Stokesshift, der in molekularen Systemen mit gebundenen und reaktiven Potentialflächen des ange-

regten Zustandes auftreten kann. In gebundenen Systemen wird der Effekt häufig durch die dielektrische Relaxation des Lösungsmittels, welches das angeregte Molekül umgibt, hervorgerufen [327, 328]. Diese Verschiebung, die durch die Lösungsmittelrelaxation induziert wird, lässt (abgesehen von einem kubischen Term in der Frequenz) die spektral integrierte Fluoreszenzintensität konstant. In reaktiven Systemen können jedoch zusätzlich zu den lösungsmittelinduzierten Effekten Bewegungen entlang interner Koordinaten stattfinden.

(ii) Für den Fall einer Bewegung mit großer Amplitude können die Franck-Condon Faktoren für die Emission, die Übergangsdipolmomente oder beide gleichzeitig variieren, was typischerweise eine Veränderung der spektral integrierten Fluoreszenzintensität zur Folge hat [328, 329]. Als Beispiele für derartige Intensitätseffekte, die sich in zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren von Molekülen mit ultraschneller Photoreaktion äußern, lassen sich Farbstoffmoleküle wie Azobenzol [330, 331] sowie Nitroanilin [332] anführen. Diese experimentellen Erfahrungen können durch quantenchemische Berechnungen gestützt werden [332, 333], die oft eine deutliche Änderung des Übergangsdipolmoments bei einer Bewegung mit großer Amplitude voraussagen.

(iii) Nach diesen Prozessen im angeregten Zustand findet der Zerfall über interne Konversion in den Grundzustand statt, der die Fluoreszenz beendet.

5.1.1 Anregungsabhängigkeit der Fluoreszenzdynamik

Zunächst wurde die Fluoreszenzdynamik von BR in Abhängigkeit von der Anregungsdichte analysiert. Für die anregungsabhängigen Fluoreszenzexperimente wurde eine Reihe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt, in denen die Anregungsdichte¹ schrittweise im Bereich von 0.3 bis zu 40 Photonen pro BR-Molekül variiert wurde.

Erwartungsgemäß sollte eine Anregung mit einem ultrakurzen Laserimpuls sehr hoher Intensität zu Mehrphotonenprozessen sowie eventuell auch zu mehrstufigen Prozessen führen. Den einfachsten Mehrphotonenprozess stellt ein Zweiphotonenprozess dar. Bei einer Anregungswellenlänge von 565 nm, wie sie hier in diesem Experiment verwendet wurde, können über einen Zweiphotonenprozess höher liegende elektronisch angeregte Zustände in einem spektralen Bereich um 280 nm erreicht werden. In diesem Spektralbereich liegen die Absorptionen von aromatischen Aminosäuren [334] sowie die ultraviolette Absorptionsbande des Retinals. Der Übergang im Retinal erfolgt aus dem Grundzustand S_0 über eine resonante Zwischenstufe S_1 in höher liegende angeregte Zustände S_n und sollte daher sehr effizient ablaufen. Wenn höher liegende Zustände S_n in BR besetzt werden, sollten sich Änderungen in der Fluoreszenzdynamik ergeben. Man erwartet strahlende Übergänge zwischen dem Zustand S_n und anderen elektronisch angeregten Zuständen. Da der angeregte Zustand S_n vermutlich schnell über interne Konversion verlassen wird, sollten diese Übergänge eine kurze Lebensdauer aufweisen, und die Fluoreszenzmaxima zeitlich leicht verzö-

¹Definition der Anregungsdichte: Produkt aus dem Absorptionsquerschnitt von BR und der Photonendichte (Anzahl der Photonen pro Fläche).

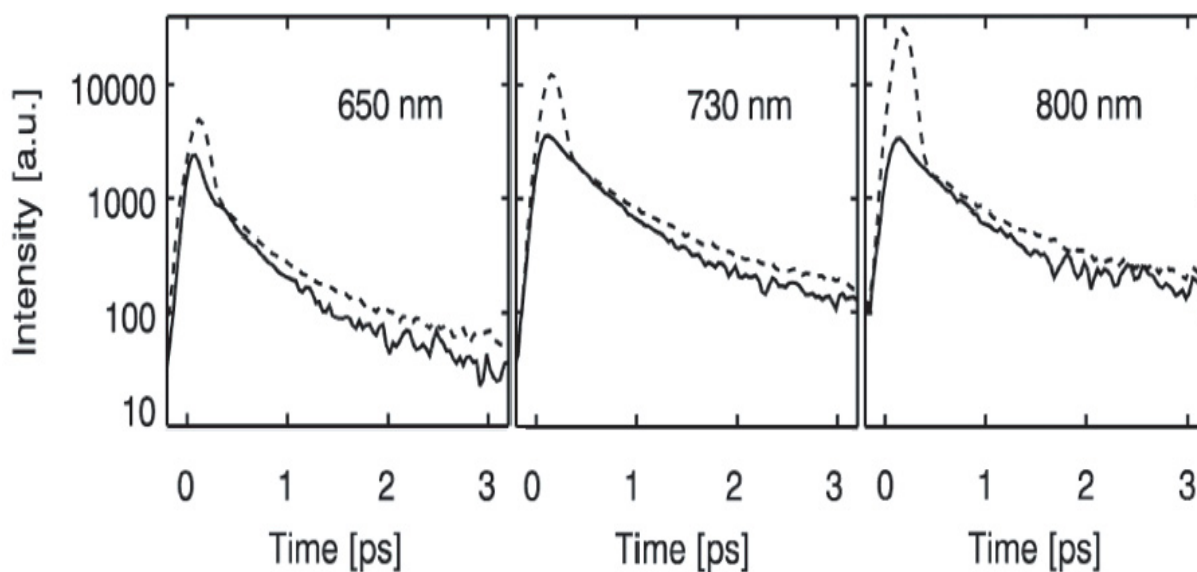


Abbildung 5.1: Einfluss der Anregungsdichten auf die Fluoreszenz. Die Zeitverläufe der Fluoreszenz sind als Funktion der Intensität (mit logarithmischer Achse) und der Verzögerungszeit abgebildet. Exemplarisch sind die Transienten für drei verschiedene Wellenlängen (650 nm, 730 nm und 800 nm) angegeben. Die durchgezogene Linie stellt die Transienten mit niedrigen Anregungsdichten von 0.3 Photonen pro BR-Molekül und die gestrichelte Linie die Transienten mit hohen Anregungsdichten von 40 Photonen pro Molekül dar. Die Transienten wurden dabei auf die Fluoreszenzintensität bei einer Verzögerungszeit von 0.3 ps normiert.

gert auftreten. Die Energieabstände zwischen höher angeregten Zuständen sind im allgemeinen kleiner als der Energieabstand des $S_0 \rightarrow S_1$ Übergangs, so dass das Fluoreszenzspektrum zu frühen Zeiten starke Anteile im roten Spektralbereich aufweisen sollte. Anzeichen für so ein Verhalten konnten schon in Fluoreszenz- [335] und Absorptionsexperimenten [336] beobachtet werden. Zur Verifizierung dieser Hypothesen wurden Experimente mit variierender Anregungsdichte durchgeführt.

Es zeigt sich, dass für Anregungsdichten unterhalb von 1 Photon pro BR-Molekül ein identisches Fluoreszenzverhalten reproduziert wird, das keine Abhängigkeit von den Anregungsdichten aufweist. Wenn die Anregungsdichten einen Wert größer als 1 Photon pro BR-Molekül erreichen, ergeben sich signifikante Änderungen im spektralen sowie zeitlichen Verhalten der Fluoreszenzintensität.

In Abb. 5.1 wird die transiente Fluoreszenzintensität bei niedriger Anregungsdichte und hoher Anregungsdichte miteinander verglichen. Die Fluoreszenzintensität ist auf einer logarithmischen Skala als Funktion der Verzögerungszeit exemplarisch bei drei verschiedenen Wellenlängen von 650 nm, 730 nm und 800 nm aufgetragen. Während die durchgezogene Linie die Fluoreszenzsignale bei niedrigen Anregungsdichten von 0.3 Photonen pro BR-Molekül darstellt, kennzeichnet die gestrichelte Linie die Fluoreszenzsignale mit hohen Anregungsdichten von 40 Photonen pro BR-Molekül.

Es ergeben sich zwei signifikante Unterschiede im transienten Fluoreszenzsignal: Erstens nimmt die Amplitude der kürzesten Zeitkonstante mit kleiner als 150 fs deutlich mit wachsender Anregungsdichte zu, deren Effekt insbesondere bei längeren Wellenlängen ausgeprägter wird. Außerdem verschieben sich die Fluoreszenzmaxima zeitlich und erscheinen zu späteren Verzögerungszeiten. Zweitens nimmt die Zerfallszeit im 0.5 ps Bereich von 0.45 ps bei niedrigen Anregungsdichten deutlich auf einen Wert von nun 0.7 ps zu. Bei dieser Komponente zeigen die spektralen Eigenschaften des Amplitudenspektrums keine Veränderungen, die von der Anregungsdichte abhängen.

Vergleicht man diese experimentellen Ergebnisse mit den vorher angenommenen Hypothesen, so zeigt sich, dass die Fluoreszenz mit hoher Anregungsdichte genau die erwarteten Eigenschaften von Mehrphotonenprozessen aufweist. Die stimulierte Emission ist bei hohen Anregungsdichten verstärkt durch einen Zerfall mit einer sehr kurzen Lebensdauer gekennzeichnet. Ferner erreicht die Fluoreszenz mit hohen Anregungsdichten ihr maximales Signal zu späteren Verzögerungszeiten als mit niedrigen Anregungsdichten. Die Amplitude der kürzesten Zeitkomponente <150 fs vergrößert sich erheblich mit wachsender Anregungsdichte. Abgesehen von einer leichten Verschiebung der Emissionsmaxima zu späteren Verzögerungszeiten, kann die kürzeste Zeitkomponente <150 fs wegen der hier erreichten Zeitauflösung nicht in zwei Anteile zerlegt werden: in einen Anteil, zu dem die niedrigen Anregungsdichten ihren Beitrag leisten, und in einen Anteil, der alleine auf den Effekt hoher Anregungsdichten zurückzuführen ist. Da die spektralen Signaturen, die von der kurzlebigen Zeitkomponente unter hohen Anregungsdichten stammen, jedoch bevorzugt im roten Spektralbereich auftauchen, legt dies nahe, dass die Emission dort von Übergängen zwischen höher liegenden angeregten Zuständen verursacht wird.

Hohe Anregungsdichten führen ferner zu einer größeren Lebensdauer des ersten angeregten Zustandes S_1 , dessen Lebensdauer sich nahezu verdoppelt. Wenn elektronisch höher angeregte Zustände im Molekül bevölkert werden, müssen sie zunächst wieder in den ersten angeregten Zustand S_1 zurückkehren, ehe die Population den S_1 verlassen kann. Der Zerfall höher angeregter Zustände über interne Konversion in den S_1 ist logischerweise mit einer bestimmten Zeitdauer verbunden, so dass sich die Fluoreszenzlebensdauer effektiv verlängert. Durch hohe Anregungsdichten wird mehr Energie für das System und seine Reaktion zur Verfügung gestellt als benötigt wird. Damit ergibt sich eine Überschussenergie, die zu heißen Molekülen führt. Bei hohen Anregungsdichten erfolgt die Reaktion nicht mehr thermisch aktiviert, sondern vollzieht sich langsamer, da die heißen Moleküle bei der Reaktion länger nach der Anregung die konische Durchschneidung suchen und diese nicht mehr so leicht finden. Diese Verlängerung der Zeitkonstante wird als Effekt hier beobachtet: der S_1 -Zustand verfügt nun über eine größere Lebensdauer, wobei sich keine Änderungen in den spektralen Signaturen ergeben.

5.1.2 Fluoreszenzdynamik bei niedrigen Anregungsdichten

Ergebnisse

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, haben zu hohe Anregungsdichten einen erheblichen Einfluss auf die Fluoreszenzdynamik. Im folgenden wird deshalb die Fluoreszenzdynamik bei adäquaten nativen Anregungsbedingungen ausführlicher beschrieben und diskutiert. Native Anregungsdichten können geschaffen werden, wenn die Anregungsdichten so niedrig gewählt werden, dass lineare Anregungsbedingungen vorliegen und dennoch ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis erreicht wird. Diese Situation kann mit Anregungsdichten von 0.3 Photonen pro BR-Molekül gewährleistet werden. Auch in einem Bereich zwischen 0.7 und 1 Photonen pro BR-Molekül ergeben sich noch keine Unterschiede bezüglich der zeitaufgelösten Fluoreszenz. Im

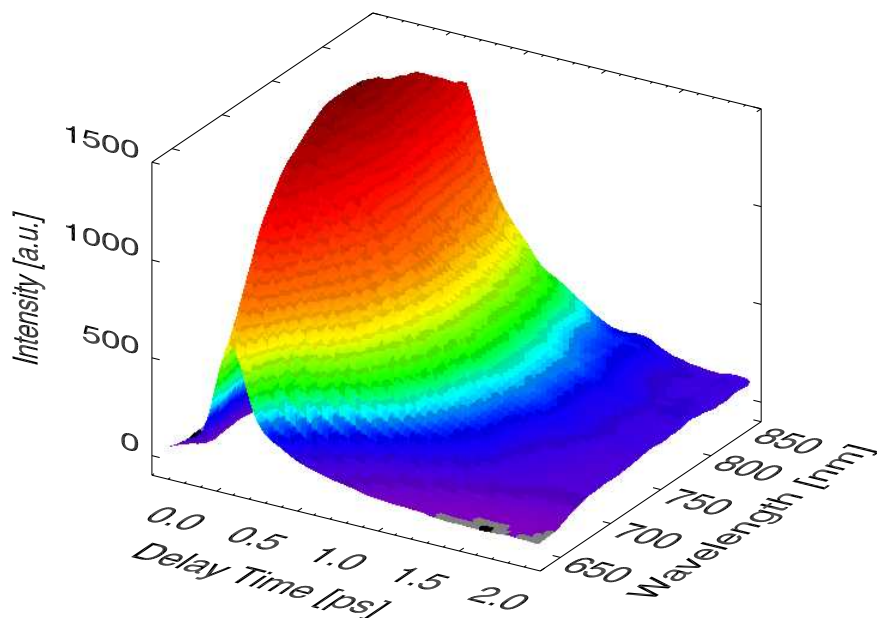


Abbildung 5.2: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von BR für niedrige Anregungsdichten von ~ 0.3 Photonen pro BR-Molekül. Die Fluoreszenzintensität ist in Abhängigkeit von der Wellenlänge in nm und der Verzögerungszeit in ps angegeben. BR emittiert eine breitbandige Fluoreszenz in einem Spektralbereich zwischen 650 nm und 850 nm, die auf einer Zeitskala von Femtosekunden und Pikosekunden zerfällt.

folgenden werden die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimente exemplarisch bei Anregungsdichten von 0.3 Photonen pro BR-Molekül vorgestellt. Wird BR mit einem ultrakurzen Laserimpuls bei einer Wellenlänge von 565 nm angeregt, emittiert es eine spektral breitbandige und sehr kurzlebige Fluoreszenz (Abb. 5.2). Diese Fluoreszenz umfasst einen spektralen Bereich von 630 nm bis einschließlich 900 nm. Qualitativ lässt sich ein biphasischer Zerfall der Fluoreszenz beobachten. Hierbei dominiert im blauen Spektralbereich eine schnellere Zeitkomponente den

Zerfall, während im roten Bereich das Spektrum eine etwas längere Zerfallskonstante von etwa 0.5 ps aufweist. Ferner erscheint zu späteren Verzögerungszeiten ein schwacher langlebiger Anteil, der einer Zerfallskonstante im Bereich von einigen Pikosekunden zugeordnet werden kann. Diesen Zerfallsprozessen ist ein dynamischer Stokesshift (eine Rotverschiebung der Fluoreszenzmaxima in der Zeit) im kurzen Zeitbereich von ca. 100 fs überlagert. Zur besseren Visualisierung dieser spektralen Verschiebung sind in einer Höhenliniendarstellung die Fluoreszenzmaxima bei jeder Wellenlänge in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit aufgetragen (Abb. 5.3). Das

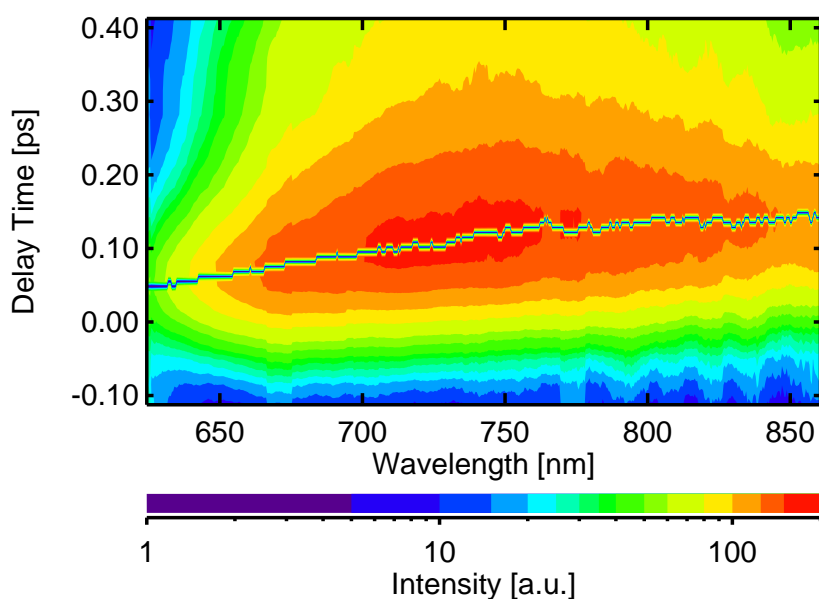


Abbildung 5.3: Darstellung der Fluoreszenzspektren bei niedrigen Anregungsdichten als Höhenlinienbild um den Zeitnullpunkt. Die Linie gibt die jeweilige Position der Fluoreszenzmaxima in Abhängigkeit von der Wellenlänge an. Die Fluoreszenzmaxima im blauen Spektralbereich erscheinen früher als im roten Spektralbereich und zeigen das Verhalten eines dynamischen Stokesshifts.

Fluoreszenzmaximum befindet sich direkt nach lichtinduzierter Anregung bei einer Wellenlänge von 650 nm. In weniger als 100 fs verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum in den roten Spektralbereich, bis es das stationäre Fluoreszenzmaximum bei 750 nm erreicht hat. In einer anderen Darstellung (Abb. 5.4), die üblicherweise zur Demonstration eines dynamischen Stokesshifts verwendet wird, ist die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums bei einem bestimmten Zeitpunkt als Funktion der Verzögerungszeit angegeben. In der Abbildung sind die Emissionsmaxima mit Kreuzen markiert. Die gestrichelte Linie dient als optische Hilfslinie, die den Trend der Verschiebung verdeutlichen soll. Die Verschiebung der Emissionsmaxima ist eindeutig sichtbar. Sie vollzieht sich in einem Spektralbereich zwischen 630 nm und 750 nm mit weniger als 100 fs.

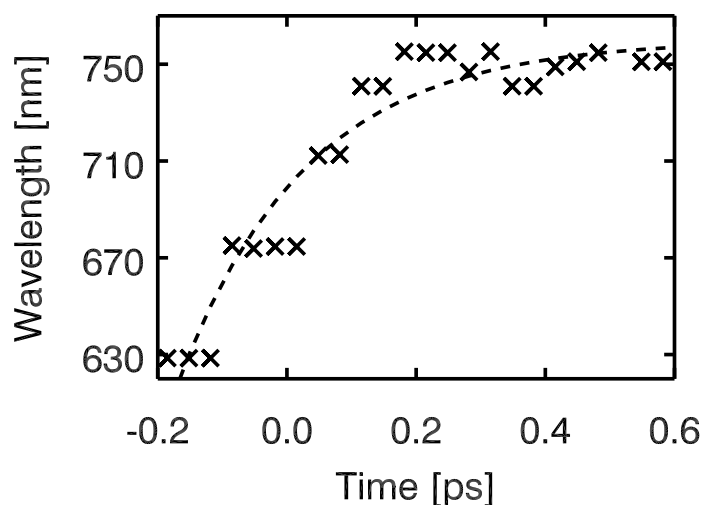


Abbildung 5.4: Dynamischer Stokesshift der Fluoreszenzspektren von BR bei niedrigen Anregungsdichten. Das stufenförmige Verhalten der Daten stammt von einem nicht vollständig korrigierbaren Messartefakt. Die gestrichelte Linie visualisiert den Trend der Verschiebung.

Mit Hilfe eines Ratenmodells, bestehend aus Exponentialfunktionen und dazugehörigen Amplituden, können die verschiedenen Zerfallsprozesse quantitativ mit drei Zeitkonstanten beschrieben werden. Für die Anpassung der Daten ergeben sich die drei Zeitkonstanten zu $\tau_1 \sim 50\text{-}150$ fs, $\tau_2 \sim 450$ fs und $\tau_3 \sim 3\text{-}10$ ps. Die Amplitude der ersten Zeitkonstante τ_1 besitzt ihr Maximum bei 650 nm und nimmt in Richtung des roten Spektralbereichs ab. Da eine Überlagerung der Fluoreszenzdynamik im blauen Spektralbereich mit dem dynamischen Stokesshift stattfindet, kann die erste Zerfallskonstante τ_1 nicht genauer bestimmt werden. Für die zweite Zeitkonstante τ_2 von ~ 450 fs erreicht die Amplitude ihren Maximalwert bei einer Wellenlänge von 750 nm, dem stationären Fluoreszenzmaximum. Die Amplitude der dritten Zeitkonstante τ_3 weist ein sehr breites Spektrum mit einem noch weiter rotwellig verschobenen Maximum auf. Da die Amplitude dieser Zeitkonstante allerdings nur einen geringen Anteil von weniger als 5 % an der gesamten initialen Fluoreszenz hat, kann für die Zeitkonstante τ_3 nur ein ungefährender Wert in einem Bereich zwischen 3 ps und 10 ps ermittelt werden.

In den hier vorgestellten Fluoreszenzmessungen an BR können alle vorher beschriebenen Eigenschaften, die für Moleküle mit einer ultraschnellen Photoreaktion charakteristisch sind, beobachtet werden. Die Maxima der Fluoreszenzspektren verschieben sich mit einer Zeitkonstante von <150 fs hin zu längeren Wellenlängen, was einen dynamischen Stokesshift auszeichnet. In einem parallelen Prozess findet ein Zerfall

der integrierten Fluoreszenzintensität auf der gleichen Zeitskala von 200 fs statt, da sich die Emissionswahrscheinlichkeit durch eine Bewegung mit großer Amplitude verringert. Über interne Konversion in den Grundzustand zerfällt der Hauptanteil der Fluoreszenz mit einer Zeitkonstante von 0.45 ps. Danach ist die Emission im wesentlichen abgeschlossen, und das Molekül befindet sich im Grundzustand.

Diskussion

Im folgenden werden die hier vorgestellten Ergebnisse aus der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie mit bekannten Resultaten aus der Literatur zur Primärreaktion von BR verglichen und diskutiert.

Bisher existieren in der Literatur nur wenige zeitaufgelöste Fluoreszenzexperimente zur Primärreaktion von BR im Femtosekundenbereich [163, 164]. In beiden Messungen basiert das Experiment auf der Up-Conversion-Technik. Du und Fleming [164] verwendeten in ihrem Experiment Laserimpulse bei 608 nm mit einer Impulsenergie von 3 nJ und einer Repetitionsrate von 100 kHz zur Anregung von BR. Dabei erreichten sie eine zeitliche Auflösung von 60 bis 70 fs. Die Fluoreszenzmessungen zeigen in einem Spektralbereich zwischen 680 nm und 900 nm einen Zerfall mit drei Zeitkonstanten, die Werte von 90-240 fs, 0.6-0.9 ps und 9.0-13.0 ps aufweisen. Die dazugehörigen Amplituden nehmen Werte von 40-70 %, 20-40 % und 5-25 % an. Diese Werte stimmen mit den Zeitkonstanten der hier präsentierten Daten qualitativ überein. Allerdings verfügt die dritte Zeitkonstante τ_3 bei Du und Fleming über eine deutlich höhere Amplitude. Diese höhere Amplitude für die Zeitkonstante τ_3 kann dadurch erklärt werden, dass bei Du und Fleming die Probe zwischen jedem Laserschuss nicht vollständig ausgetauscht wurde. Die Probe wurde dort mit 20 Hz ausgetauscht, wobei die Anregung jedoch mit einer Repetitionsrate von 100 kHz erfolgte. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Akkumulation von nachfolgenden Intermediaten verursacht wurde.

Die zweite Veröffentlichung, die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an BR behandelt, stammt von Haacke et al. [163]. In ihren Experimenten regten sie BR bei einer Wellenlänge von 585 nm mit einer Repetitionsrate von 80 MHz an, wobei eine deutlich geringere Zeitauflösung von 250 fs erreicht wurde. Das Fluoreszenzsignal wurde in einem Spektralbereich zwischen 500 nm und 850 nm detektiert. Die Daten wurden biexponentiell mit einer Zeitkonstante von 400 fs und einer etwas langsameren Zeitkonstante kleiner als 10 ps angepasst. Dabei wird das Fluoreszenzsignal mit 96 % von der kurzen Zeitkonstante dominiert, während die längere Zeitkonstante nur gering mit einem Anteil von 4 % zum Signal beiträgt. Die kürzere Zeitkonstante von 400 fs weist eine Abhängigkeit von der Detektionswellenlänge auf. Sie nimmt im roten Spektralbereich von 400 fs in Richtung des blauen Spektralbereichs auf 150 fs ab. Die zweite Zeitkonstante dagegen zeigt kein wellenlängenabhängiges Verhalten. Wegen der schlechteren Zeitauflösung konnten zeitliche Prozesse unterhalb von 250 fs nicht mehr aufgelöst werden. Die beiden Zeitkonstanten von Haacke et al. decken sich innerhalb der experimentellen Ungenauigkeit mit den hier vorgestellten Ergeb-

nissen. Dies betrifft auch die Amplitudenhöhe der längeren Zeitkonstante. Allerdings konnte keine Abhängigkeit der 400 fs Zeitkomponente von der Detektionswellenlänge beobachtet werden. In beiden bekannten Fluoreszenzexperimenten aus der Literatur konnte außerdem kein dynamischer Stokesshift gefunden werden.

Von transienten Absorptionsmessungen sind drei Zeitkonstanten im Femto- und Pikosekundenbereich bekannt: 30-200 fs, 400-500 fs und 3-5 ps [24, 101, 103, 160, 181]. Die ersten beiden Zeitkonstanten stimmen sehr gut mit den hier vorgestellten Fluoreszenzmessungen überein. Die Zeitkonstanten werden folgenden Prozessen zugewiesen: Zunächst erfolgt nach einer lichtinduzierten Anregung die Besetzung des angeregten Zustandes, in dem ein Wellenpaket präpariert wird. Innerhalb von weniger als 200 fs verlässt das im S_1 präparierte Wellenpaket den Franck-Condon Bereich und erreicht das Potentialminimum des angeregten Zustandes, der entlang einer konischen Durchschneidung mit 500 fs verlassen wird. Die Produktbildung des *cis*-Retinalisomers vollzieht sich mit 3-5 ps. Diese Produktbildung findet nicht mehr im angeregten Zustand statt, so dass sie als Prozess in der Fluoreszenz nicht beobachtet werden sollte. Die längere Zeitkonstante mit geringer Amplitudenstärke in der Fluoreszenz (3-10 ps) kann BR-Molekülen mit gelockten Retinalen zugeordnet werden [160, 337]. Sterisch blockierte Retinale, die keine Isomerisierung mehr durchführen können und dadurch für die Isomerisierungsreaktion inaktiv sind, weisen ebenfalls die beiden ersten Zeitkonstanten im Femtosekundenbereich von 50-100 fs und 0.4-2 ps auf [160, 165-167, 337]. Ferner erscheint eine zusätzliche Zeitkonstante im Bereich von 4-20 ps. Die längere Zeitkomponente von 3-10 ps in den hier vorgestellten Messungen liegt sehr gut in diesem für gelockte Retinale bekannten Bereich. Außerdem lässt sich auch die geringe Amplitude dieser Zeitkonstante dadurch erklären, dass nur ein sehr geringer Anteil der BR-Moleküle in inaktivierter Form vorliegt.

Ein dynamischer Stokesshift wurde bisher in transienten Absorptionsexperimenten sowie in zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimenten noch nicht erwähnt. In [103] werden jedoch Zeitabhängigkeiten im Bereich der stimulierten Emission vorgestellt, die einen beschleunigten Zerfall bei kurzen Wellenlängen zeigen. Bei kurzen Wellenlängen dominiert die Zeitkomponente von 100-200 fs, während der Zerfall im langwelligen Spektralbereich (>770 nm) hauptsächlich durch die Zeitkomponente von 500 fs gekennzeichnet ist. Die Emission verschiebt sich eher zeitlich zu längeren Wellenlängen als gleichförmig zu zerfallen.

Die meisten Ergebnisse aus transienten Absorptionsmessungen postulieren ein instantanes Auftreten der Emission [157, 160, 161, 338]. Allerdings gibt es Hinweise, welche die Existenz eines dynamischen Stokesshifts unterstützen. In den Daten von Ye et al. [339] tritt der Anstieg der stimulierten Emission im Spektralbereich zwischen 800 nm und 950 nm um 30 fs verzögert auf. Diese Verzögerung vollzieht sich in einem wesentlich kürzeren Zeitbereich als der hier beobachtete Stokesshift. Im Maximum der Fluoreszenz kann in transienten Absorptionsexperimenten nahezu keine stimulierte Emission detektiert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass in diesem Spektralbereich die Absorption aus dem angeregten Zustand (ESA) zum Signal beiträgt [157, 158, 161]. Die spektrale Dynamik in der Fluoreszenz oder in der tran-

sienten Absorption müssen daher nicht unbedingt identisch sein. Hier liegen noch Diskrepanzen vor, die weitere Untersuchungen erfordern. Hierbei muss besonders auf die Bestimmung des Zeitnullpunktes geachtet werden, der durch unabhängige Methoden genau festgelegt werden muss.

Die in [164] gefundene große Amplitude der langsamen Emissionskomponente kann durch die dort vorliegenden Anregungsbedingungen mit zu hohen Anregungsdichten und ungenügendem Probenaustausch erklärt werden.

5.2 Transiente Absorptionsspektroskopie

Der erste schnelle Prozess in der Primärreaktion von BR, der in weniger als 200 fs abläuft, wurde zusätzlich mit einer komplementären spektroskopischen Methode, der transienten Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich, untersucht. In Abbildung 5.5 sind die transienten Spektren der Absorptionsänderung von BR in

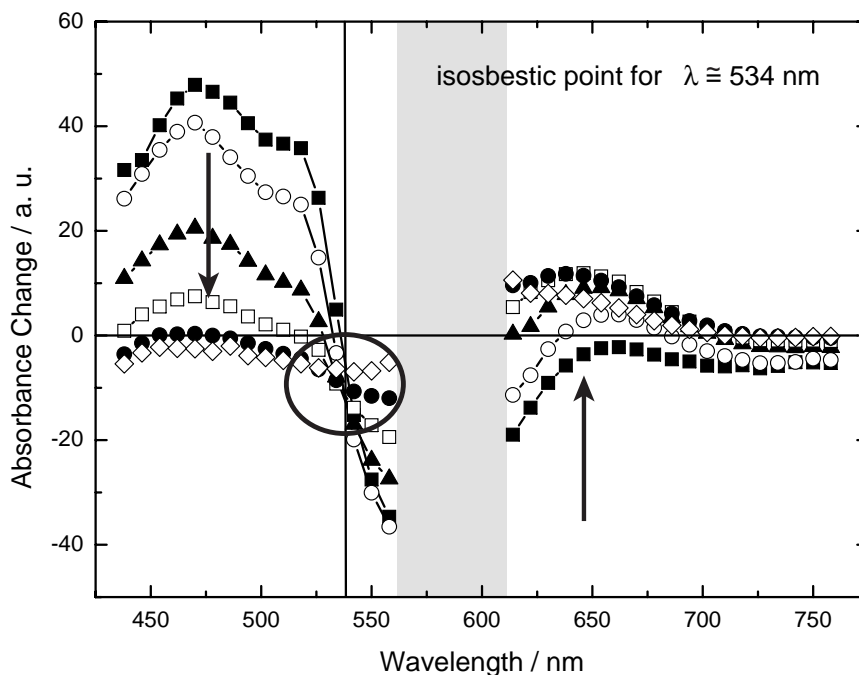


Abbildung 5.5: Zeitschnitte von BR bei den Verzögerungszeiten 0.1 ps, 0.2 ps, 0.5 ps, 1.0 ps, 2.0 ps, 100 ps. Der graue Bereich deutet die spektrale Breite des Anregungsimpulses an. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen den Zerfall der Zeitschnitte bei kurzen Verzögerungszeiten in Richtung zu längeren Verzögerungszeiten. Bei einer Wellenlänge von etwa 534 nm befindet sich ein isobestischer Punkt.

Abhängigkeit von der Abtastwellenlänge aufgetragen. Für die verschiedenen transienten Spektren wurden die Verzögerungszeiten mit den Werten von 0.1 ps, 0.2 ps,

0.5 ps, 1.0 ps, 2.0 ps, 100 ps gewählt. Der graue Bereich deutet die spektrale Breite des Anregungsimpulses an. Die schwarzen Pfeile zeigen die Reihenfolge der transienten Spektren zu längeren Verzögerungszeiten hin an. In der transienten Absorption können als spektrale Signaturen die ESA im blauen Spektralbereich, das Ausbleichen des Grundzustandes um 570 nm und die Bildung des ersten Photoprodukts, das J-Intermediat, mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm sowie die des zweiten Photoprodukts im Grundzustand, das K-Intermediat, mit einem Maximum um 630 nm beobachtet werden. Der angeregte Zustand von BR ist durch die ESA und die stimulierte Emission charakterisiert. In transienter Absorption wird die schnelle Zeitkonstante der stimulierten Emission, die in einem Bereich zwischen 30 fs und 200 fs liegt, im Spektralbereich zwischen 650 nm und 850 nm aber von anderen Signalbeiträgen überlagert. Im blauen Spektralbereich findet man in den transienten Spektren einen isosbestischen Punkt bei einer Wellenlänge von ca. 534 nm, der die Möglichkeit für eine detaillierte Analyse bietet. Dieser isosbestische Punkt wurde, soweit bekannt, hier zum ersten Mal für eine solche Analyse verwendet.

Ein isosbestischer Punkt stellt einen Schnittpunkt in den Absorptionsspektren dar, an dem zwei Spezies mit verschiedenen Absorptionsmaxima eine identische Absorption aufweisen. Bei einem Übergang zwischen diesen Spezies ändert sich dann die Absorption der Probe nicht. Am hier beobachteten isosbestischen Punkt kompensieren sich gerade die verschiedenen Effekte, die mit dem Zerfall des angeregten Zustandes mit 400 fs verbunden sind. Somit kann man die Vorgänge, die zeitlich im Bereich unter 400 fs liegen, besser voneinander trennen.

In Abb. 5.6 sind die Zeitverläufe der transienten Absorption in einem Spektralbereich um den isosbestischen Punkt bei 534 nm angegeben. Dazu ist die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit für die Abtastwellenlängen zwischen 518 nm und 550 nm dargestellt. Für die beiden Transienten bei 518 nm und 526 nm erfolgt am Zeitnullpunkt ein instrumentell limitiertes Ansteigen des ESA-Signals, das anschließend einen exponentiellen Zerfall zeigt, bevor es einen konstanten Wert mit negativer Absorptionsänderung erreicht. Bei der Transienten mit einer Wellenlänge von 534 nm steigt die ESA ebenso um den Zeitnullpunkt an, zerfällt aber sofort wieder. Für Verzögerungszeiten größer als 400 fs verbleibt ein konstantes negatives Signal. Bei den Transienten für Wellenlängen größer als 534 nm zeigt sich dieses Verhalten um den Zeitnullpunkt noch ausgeprägter. Hier wird der Anstieg in der Amplitude immer kleiner und weist eine noch kürzere Zerfallszeit auf, so dass sich das Signal schnell in die stimulierte Emission umkehrt. Das transiente Absorptionssignal um den Zeitnullpunkt, das zunächst anklingt und sofort wieder zerfällt, stammt eindeutig von BR.² Am isosbestischen Punkt bei 534 nm kann der alleinige Beitrag des ersten schnellen Prozesses extrahiert werden. Dazu wurde im transienten Absorptionssignal (Abb. 5.7) der frühe Zeitbereich bis 400 fs mit einem exponentiellen Zerfall, der mit einer Gaussfunktion (FWHM von 60 fs) gefaltet ist, angepasst.

²Das Lösungsmittel besitzt um den Zeitnullpunkt ein transientes Absorptionssignal (Lösungsmittelartefakt), das im Vergleich zum transienten Absorptionssignal von BR nur 6 % ausmacht.

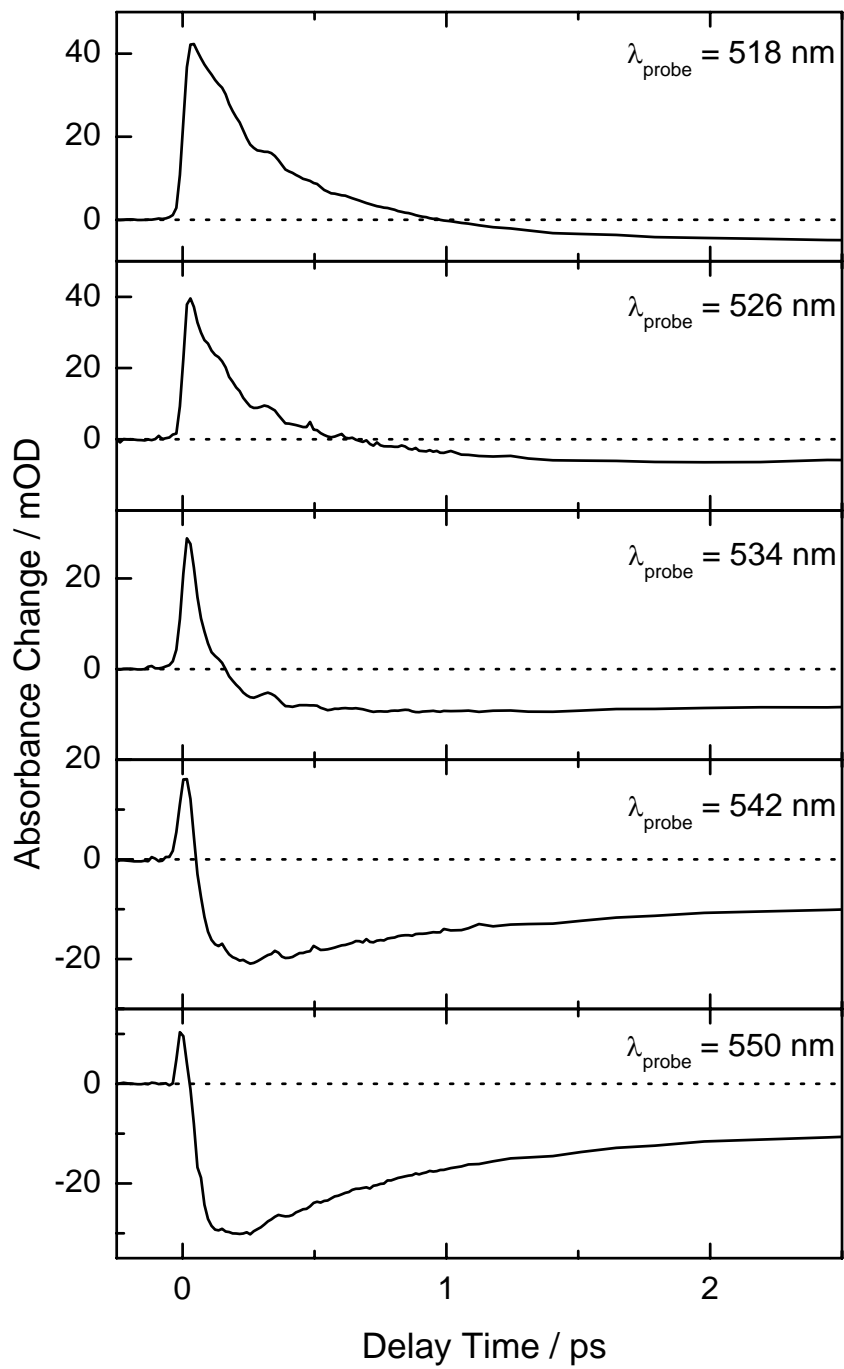


Abbildung 5.6: Die Absorptionsänderung ist für verschiedene Abtastwellenlängen in einem Spektralbereich um 534 nm in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit dargestellt.

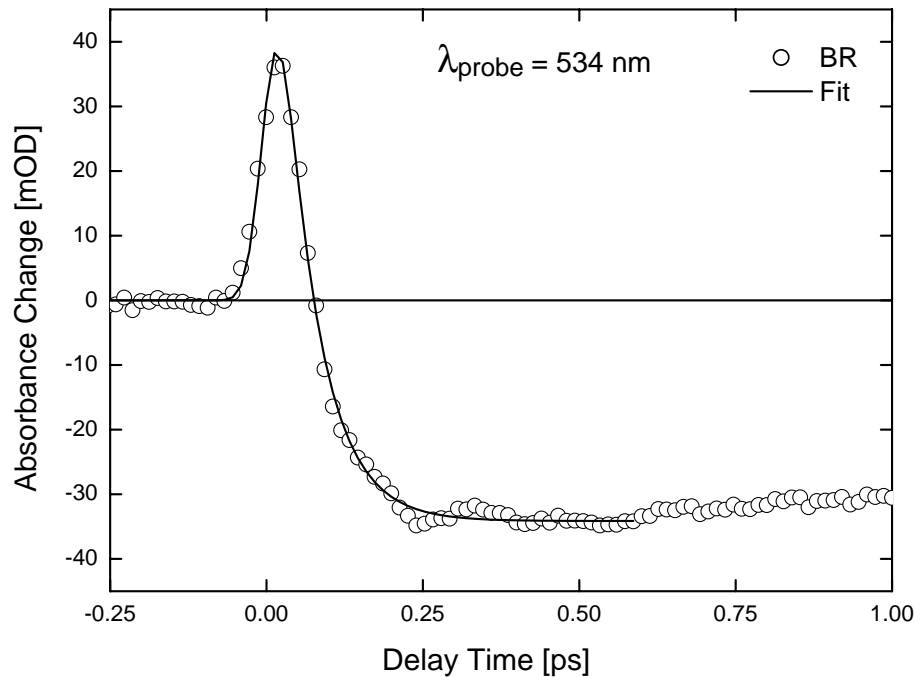


Abbildung 5.7: Transiente von BR bei einer Abtastwellenlänge am isosbestischen Punkt von 534 nm (offene Kreise). Eine Datenanpassung (durchgezogene schwarze Linie) mit einer Exponentialfunktion, die mit einer Gaussfunktion gefaltet ist, ergibt eine Zerfallszeit für den ersten Prozess von 50 fs.

Die Zeitkonstante, die mit Hilfe einer exponentiellen Datenanpassung ermittelt wurde, dient als Maß für einen ersten schnellen Prozess. In Abb. 5.7 kennzeichnen die offenen Kreissymbole die gemessenen Datenpunkte von BR und die durchgezogene Linie die exponentielle Datenanpassung im vorderen Zeitbereich bis 500 fs. Die Anpassung dieses kurzlebigen Signals ergibt einen Zerfall mit einer Zeitkonstante von 50 fs. Weitere Datensätze von BR, die mit einer schlechteren Zeitauflösung gewonnen wurden, liefern Zeitkonstanten, die in einem Bereich zwischen 70 fs und 95 fs liegen. Der isosbestische Punkt kann auch in den Messungen der vier Proben der BR-Mutante D85T (D85T1, D85T2, D85T3 und D85T4) beobachtet werden, der hier bei einer Wellenlänge von 542 nm auftritt (vgl. Tabelle 5.1). In den Mutanten erscheint ebenfalls dieser erste schnelle Prozess, der sich innerhalb von ca. 35 fs vollzieht und damit die gleiche Größenordnung wie in BR aufweist.

Der Spektralbereich, in dem der isosbestische Punkt liegt, befindet sich bei kürzeren Wellenlängen als die spektrale Lage des Anregungsimpulses. Der isosbestische Punkt bietet die Möglichkeit, den ersten Prozess, der extrem schnell innerhalb von <100 fs abläuft, im Detail zu analysieren.

Bei BR liegt der isosbestische Punkt bei einer Abtastwellenlänge von 534 nm. Im

Probe	Zeitkonstante für den ersten schnellen Prozess [fs]
BR	50-95
D85T1	37
D85T2	30
D85T3	38
D85T4	25

Tabelle 5.1: Übersicht zur Größenordnung des ersten schnellen Prozesses für BR und für die BR-Mutanten D85T (D85T1, D85T2, D85T3 und D85T4).

Vergleich dazu befand sich im Experiment die Zentralwellenlänge des Anregungsimpulses im langwelligeren Spektralbereich bei 570 nm. Am isosbestischen Punkt bei ~ 535 nm ist der erste schnelle Prozess in BR durch eine Zeitkonstante von ca. 50 fs gekennzeichnet.

Bei den Proben der BR-Mutante D85T erscheint ein isosbestischer Punkt bei 542 nm, der gegenüber BR geringfügig zu längeren Wellenlängen verschoben ist. Für die Experimente an den Proben der BR-Mutante D85T wurden Anregungsimpulse mit einer Zentralwellenlänge bei 580 nm verwendet. Hier ist der erste schnelle Prozess am isosbestischen Punkt bei 542 nm durch eine Zeitkonstante von ca. 35 fs charakterisiert.

Die beobachteten Ergebnisse lassen sich in dem folgenden Bild schematisch beschreiben:

Das breite stationäre Absorptionsspektrum von BR deutet auf einen inhomogen verbreiterten Übergang hin, der sich aus der Kopplung des elektronischen Übergangs an niederfrequente Torsionsmoden ergibt. Die Einhüllende des Absorptionsspektrums setzt sich in diesem Bild aus mehreren schmalbandigeren Absorptionslinien zusammen (Abb. 5.8a)). Werden Moleküle mit einem kurzen Laserimpuls angeregt, so absorbiert ein großer Anteil der Moleküle im Bereich der eingestrahlten Wellenlänge des Laserimpulses und geht optisch in den elektronisch angeregten Zustand. Da im Grundzustand nun weniger Moleküle vorhanden sind, die bei der eingestrahlten Wellenlänge absorbieren können, entsteht in der Absorptionsbande bzw. in der Schwingungsverteilung bei dieser Wellenlänge ein spektrales Loch mit einer gewissen spektralen Breite (rot eingezeichnete Absorption in Abb. 5.8b)). Durch thermische Fluktuationen (Schwingungsumverteilung) wird der durch das Lochbrennen erzeugte Nicht-Gleichgewichtszustand wieder ausgeglichen. Dies führt zu einer spektralen Diffusion, wodurch sich wieder die ursprüngliche Form des Absorptionsspektrums (rot in Abb. 5.8c)) einstellt. Die Amplitude des Absorptionsspektrums jedoch nimmt im Vergleich zum ursprünglichen Absorptionsspektrum (schwarz in Abb. 5.8c)) ab.

In BR wurde ein breites spektrales Loch bereits in transienten Absorptionsexperimenten in einem Spektralbereich zwischen 565 nm und 650 nm beobachtet [103, 181,

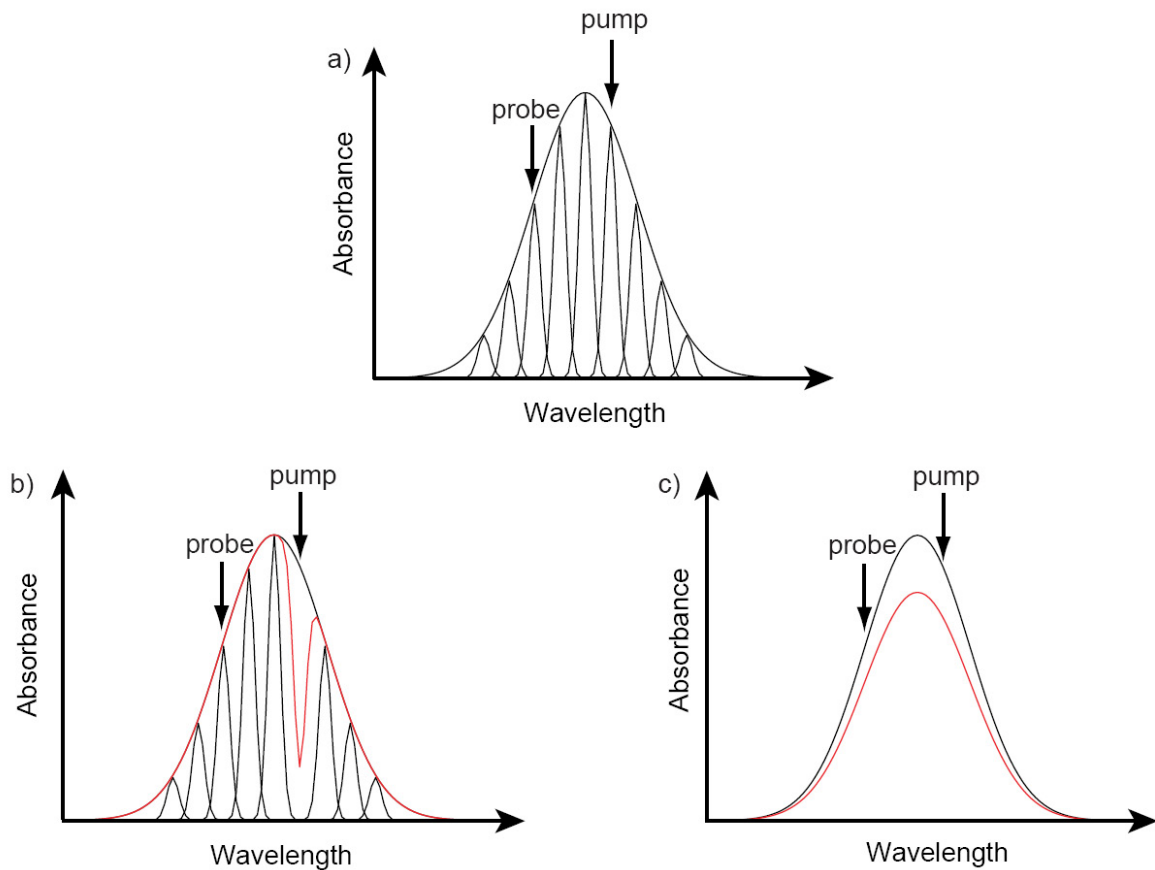


Abbildung 5.8: Spektres Lochbrennen: a) inhomogen verbreiterte Absorptionsbande (schwarz), b) Erzeugung eines spektralen Loches (rot), c) Auffüllen des spektralen Loches durch Umverteilung, die zur Abnahme der gesamten Absorption führt (rot).

340]. Bei diesen Experimenten, die Anregungsimpulse bei einer Zentralwellenlänge von 620 nm verwendeten, wurde ein spektrales Loch um 620 nm erzeugt, das sich im Ausbleichen des Grundzustandes äußerte. Das spektrale Loch verbreiterte sich dynamisch auf der Zeitskala von 150 fs.

Im vorliegenden Experiment erfolgte die Anregung spektral bei kürzeren Wellenlängen ($\lambda < 620$ nm). Außerdem sollen hier in der Diskussion andere bekannte Phänomene wie die ESA und der dynamische Stokesshift berücksichtigt werden.

Die hier verwendeten Anregungsimpulse, die mit einer Zentralwellenlänge von 570 nm für BR (bzw. 580 nm für die BR-Mutanten) und mit einer spektralen Breite von $\lambda = 30$ nm charakterisiert sind, erzeugen eine Anregung von BR in den ersten angeregten Zustand S_1 . Dieser Anregungsprozess ist mit der Bildung des spektralen Loches verbunden. Direkt nach der Anregung liegt die kurzwellige Abtastwellenlänge von ~ 535 nm zunächst außerhalb des eigentlichen Loches, so dass nur die ESA detektiert werden kann. Die Anregung bewirkt hier im wesentlichen eine Absorptionzunahme

durch die ESA. Mit der zeitlichen Entwicklung verbreitert sich das Loch dynamisch und erreicht sehr schnell den Bereich der Abtastwellenlänge bei ~ 535 nm, was nun zu einer Absorptionsabnahme führt.

Die gemessene Zeitkonstante von ~ 50 fs gibt ein Maß für die Verbreitungsgeschwindigkeit des Loches an. Auf der langwelligen Seite des Absorptionsmaximums kann ebenfalls die Dynamik des spektralen Loches auftreten. Jedoch ist hier die ESA wesentlich geringer, so dass zunächst nur das (leicht verzögerte) Ausbleichen beobachtet werden kann. Direkt anschließend findet man hier Effekte, die auf dem dynamischen Stokesshift beruhen, die der Dynamik des spektralen Loches auch überlagert sein können.

5.3 Diskussion des dynamischen Stokesshifts in Bezug auf Modelle zur Primärreaktion

Im folgenden wird der dynamische Stokesshift, der aus den transienten Absorptions- und Fluoreszenzexperimenten ermittelt wurde, in Bezug auf die unterschiedlichen etablierten Modelle zur Beschreibung der Primärreaktion von BR diskutiert. Die sich aus den Modellen ergebenden Hypothesen werden dabei mit den Eigenschaften des dynamischen Stokesshifts verglichen.

Zur Charakterisierung der Primärreaktion von BR existieren zahlreiche Modelle, die im Abschnitt des Grundlagenkapitels 2 über Retinalproteine bereits vorgestellt wurden. Die Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl der beteiligten Potentialflächen und können in zwei Gruppen klassifiziert werden. In der einen Gruppe werden im Modell zwei Potentialflächen verwendet, der elektronische Grundzustand und der elektronisch angeregte Zustand, die ausreichen, um die photochemischen Prozesse der Primärreaktion von BR zu beschreiben. Zu diesen Modellen zählen die Zwei-Zustandsmodelle mit Überdämpfung, Zwei-Moden und Viel-Moden [19, 103, 181, 190, 191, 195, 338]. Zur anderen Gruppe gehört als Modell das Drei-Zustandsmodell, das zusätzlich zu den beiden Potentialflächen noch den zweiten angeregten Zustand berücksichtigt, der direkt mit dem ersten angeregten Zustand eine Wechselwirkung eingeht.

Das Drei-Zustandsmodell (Abb. 5.9 d [159, 161]) postuliert die Existenz einer Barriere im angeregten Zustand, die durch die Wechselwirkung des ersten angeregten Zustandes mit dem zweiten angeregten Zustand entsteht. Die Anregung erfolgt dabei in eine relativ flache Region des Franck-Condon Bereichs. Die Barriere im angeregten Zustand wird mit einer Zeitkonstante von 500 fs überwunden und es bildet sich das J-Intermediat, das sich im angeregten Zustand befindet. Da die Franck-Condon aktive Region im Drei-Zustandsmodell einen relativ flachen Bereich aufweist und von der reaktiven Region mit ihrer sehr steilen Form durch eine Barriere getrennt ist, wird in diesem Modell kein dynamischer Stokesshift erwartet. Vielmehr sollte die stimulierte Emission gleichzeitig bei allen Wellenlängen instantan einsetzen. Insofern kann die Beobachtung des dynamischen Stokesshifts nicht mit diesem Modell zur

5.3 Diskussion des dynamischen Stokesshifts in Bezug auf Modelle zur Primärreaktion

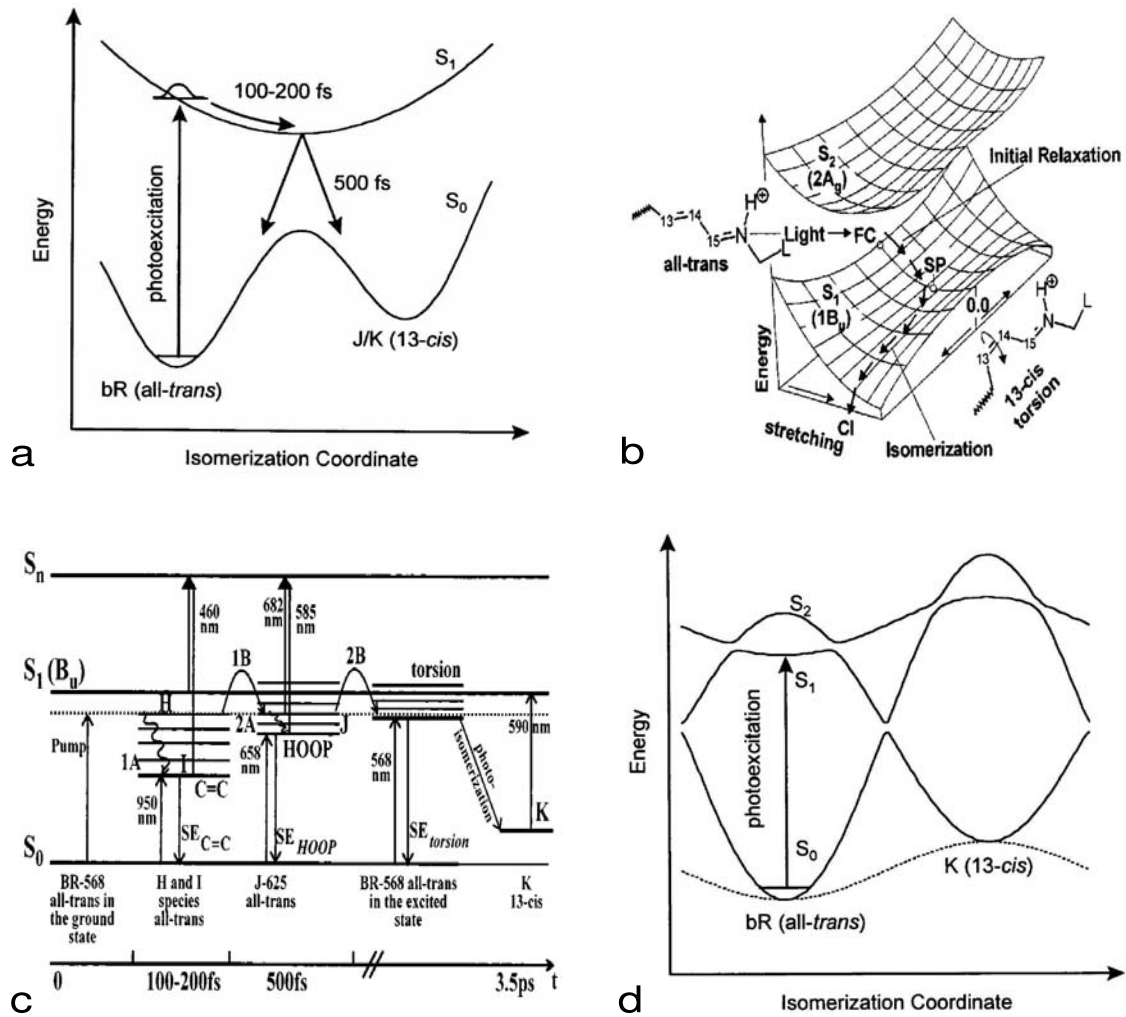


Abbildung 5.9: Reaktionsmodelle zur Beschreibung der Primärreaktion von BR. a)-c) Zwei-Zustandsmodelle: a) überdämpfter Fall [103, 181], b) Zwei-Moden Modell [191, 195, 338], c) Viel-Moden Modell [190]. d) Drei-Zustandsmodell [159, 161].

Beschreibung der Primärreaktion von BR in Einklang gebracht werden.

Die Gruppe der Zwei-Zustandsmodelle kann weiter unterteilt werden, je nachdem wie die Bewegungen auf der angeregten Potentialfläche spezifiziert werden: in ein inertiales Modell [19] und in ein Modell mit Überdämpfung [103, 181]. Im inertialen Modell [19] erfolgt der Zerfall des elektronisch angeregten Zustands schneller als die Schwingungsrelaxation. Im Modell mit Überdämpfung (Abb. 5.9 a [103, 181]) dagegen verlässt das im angeregten Zustand generierte Wellenpaket in einem Zeitbereich von weniger als 200 fs den Franck-Condon Bereich des angeregten Zustandes. Es erfährt ein repulsives Potential und bewegt sich entlang eines barrierelosen Pfades. Dieses Modell erfordert einen dynamischen Stokesshift, wenn sich das Wellenpaket aus der aktiven Franck-Condon Region ins Potentialminimum bewegt. Die zeitliche

Dauer des dynamischen Stokesshifts entspricht der Bewegung im angeregten Zustand mit weniger als 200 fs, was mit den hier vorgestellten Ergebnissen gut übereinstimmt. Als weiteres Zwei-Zustandsmodell wird das Viel-Moden Modell (Abb. 5.9 c [190]) diskutiert. Es umfasst zusätzlich zur niederfrequenten Torsionskoordinate mehrere hochfrequente Moden, entlang derer die Reaktion abläuft. Dabei wird nacheinander eine Schwingungskordinate nach der anderen sukzessive angeregt. Zunächst relaxiert die Streckschwingung mit 200 fs, an die sich die Relaxation der HOOP-Moden anschließt, bevor über eine Torsion die Isomerisierung eingeleitet wird. Wird der K-Zustand erreicht, ist die Isomerisierungsreaktion nach etwa 3.5 ps abgeschlossen. In diesem Modell werden keine Annahmen über die Form oder den Verlauf der angeregten Potentialfläche gemacht. Daher kann ein möglicher Stokesshift weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Das Zwei-Zustandsmodell mit Zwei-Moden bezieht in seinem Modell neben der niederfrequenten Torsionskoordinate eine hochfrequente Streckschwingungskordinate als weitere Reaktionskoordinate mit ein (Abb. 5.9 b [191, 195]). Das Wellenpaket verlässt den Franck-Condon Bereich des angeregten Zustandes, wobei eine Relaxation entlang der C-C-Streckschwingung in weniger als 200 fs stattfindet. Das Zwei-Zustandsmodell mit Zwei-Moden ist ebenfalls in der Lage, das Auftreten des dynamischen Stokesshifts zu erklären. In diesem Modell hängen die Fluoreszenzdynamiken zu frühen Verzögerungszeiten von der anfänglichen spektralen Verteilung und der Zeitskala der Relaxation entlang der Streckschwingungskordinate ab. Es können aber auch Modelle zur Erklärung eines dynamischen Stokesshifts herangezogen werden, die in der Franck-Condon aktiven Region einen Verzweigungsmechanismus, der zu verschiedenen molekularen Pfaden führt, beinhalten. Eine solche Verzweigung setzt allerdings anstatt einer Reaktionskoordinate, der Torsionskoordinate, mehrere Reaktionskoordinaten voraus [160]. Eine Verzweigung in eine reaktive und eine nichtreaktive Schwingungskordinate könnte beispielsweise einen dynamischen Stokesshift zur Folge haben. Der dynamische Stokesshift vollzieht sich auf der Zeitskala der Relaxation entlang der nichtreaktiven Schwingung. Der Pfad entlang der reaktiven Reaktionskoordinate führt zur Isomerisierung.

Jedoch bietet die hier vereinfachte Betrachtung der experimentellen Ergebnisse keine Möglichkeit, Mechanismen zur Beschreibung der Primärreaktion von BR hinsichtlich der bekannten Modelle eindeutig festzulegen. Eine genaue Zuordnung würde die Durchführung von theoretischen Simulationen für jedes Modell erfordern, um durch einen Vergleich der Simulationen mit den experimentellen Ergebnissen Aussagen über die beteiligten Mechanismen zu treffen sowie zu entscheiden, welche der zugrundeliegenden Modelle diese Eigenschaften am besten beinhalten. Theoretische Berechnungen für Fluoreszenzmessungen besitzen den großen Vorteil, dass sie wesentlich leichter realisiert werden können, da für die Berechnungen keine Signalbeiträge der ESA des angeregten Zustandes mitberücksichtigt werden müssen, wie dies bei transienten Absorptionmessungen erforderlich wäre.

5.4 Zusammenfassende Bemerkung

In diesem Kapitel wurden die initialen Bewegungen auf dem angeregten Zustand in BR mit Hilfe zwei sich ergänzender Spektroskopiemethoden im Femto- und Pikosekundenbereich untersucht: die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie basierend auf der Kerr-Schalter-Technik und die transiente Absorptionsspektroskopie mit breitbandigem Weißlichtkontinuum als Abtastimpuls. Es wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzexperimente an BR in Abhängigkeit von der Anregungsdichte über einen großen Spektralbereich von 630 nm bis 900 nm durchgeführt. Bei hohen Anregungsdichten treten Änderungen in den zeitaufgelösten Spektren sowie in der Dynamik auf, die Mehrphotonenprozessen zugewiesen werden können. Diese Mehrphotoneneffekte können einige bestehende Diskrepanzen in der Literatur, die die Primärreaktion von BR betreffen, erklären. Für niedrige Anregungsdichten kann die Fluoreszenzdynamik näherungsweise biexponentiell mit den Zeitkonstanten <0.15 ps und 0.45 ps beschrieben werden. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit Experimenten in der Literatur überein. Der primären Kinetik ist ein dynamischer Stokesshift, eine Rotverschiebung der Fluoreszenzmaxima in der Zeit, überlagert, der erstmals beobachtet werden konnte. Die Verschiebung vollzieht sich mit einer charakteristischen Zeit von <0.15 ps, die auf einen schnellen Umordnungsprozess auf der reaktiven Potentialfläche hindeutet.

Ferner wurde der erste schnelle Prozess (<200 fs) mit Hilfe transienter Absorptionsspektroskopie an BR sowie an den BR-Mutanten D85T im grünen Spektralbereich untersucht. Dabei wurde BR am isosbestischen Punkt bei 534 nm im Detail analysiert, was zu einer genaueren Charakterisierung des ersten Prozesses (<200 fs) führte. Bei dieser Wellenlänge wurde die Bildung und Auswirkung eines spektralen Loches beobachtet. Damit ergibt sich dort das folgende Verhalten: Zuerst wird die Absorption aus dem angeregten Zustand (ESA) sichtbar, die instantan mit der Anregung auftritt. Das Ausbleichen des Grundzustandes erscheint mit ca. 50 fs verzögert. Daran schließt sich der dynamische Stokesshift an.

6 Vorbereitung zur Reaktionskontrolle von BR: Kontrollexperiment an Oxazin

6.1 Allgemeine Beschreibung eines kohärenten Kontrollexperiments

Eine chemische Reaktion auf der molekularen Skala aktiv zu kontrollieren und somit den Ausgang der Reaktion effizient in die gewünschte Richtung zu lenken, wäre wünschenswert. Dies würde erlauben, zum einen die spezifische Synthese von chemischen Produkten zu begünstigen und gleichzeitig unerwünschte Nebenprodukte zu reduzieren. Dabei könnten z. B. chemische Bindungen im Molekül selektiv gebrochen bzw. erzeugt werden. Chemische Kontrollgrößen, die in der chemischen Synthese zum Einsatz kommen, sind i. a. makroskopische Variable. Dazu gehören die Temperatur, der Druck oder die Konzentration, die aber keine direkte Zugangsmöglichkeit zum quantenmechanischen Reaktionspfad gewähren. Um eine direkte molekulare Zugangsmöglichkeit zu erhalten, kann man die Wechselwirkung des Moleküls mit einem elektromagnetischen Feld heranziehen. Dies kann mit Hilfe von speziellen maßgeschneiderten Lichtfeldern realisiert werden. Dadurch kann in die quantenmechanische Dynamik des Systems eingegriffen werden und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass sich das System entlang eines spezifischen Pfades zum gewünschten Zielzustand entwickelt. Mit dem Konzept der sogenannten modenselektiven Chemie kann Schwingungsenergie in eine chemische Bindung oder in eine Bewegung entlang einer Reaktionskoordinate positioniert werden. Im einfachsten Bild sollte dabei ein resonant eingestrahelter Laserimpuls, dessen Frequenz der charakteristischen lokalen Schwingungsfrequenz des Moleküls entspricht, zu großen Schwingungsamplituden führen. Diese sollten schließlich die korrespondierende Bindung zum Brechen bringen. Im allgemeinen führt die Kopplung zwischen den verschiedenen Freiheitsgraden im Molekül jedoch zur schnellen intramolekularen Umverteilung der Schwingungsenergie, so dass die Selektivität des Prozesses reduziert wird oder gänzlich verloren geht.

Quantenmechanisch kann der Kontrollprozess folgendermaßen einfach beschrieben werden: Ein molekularer Zustand kann auf zwei verschiedenen Pfaden zum Endzustand gelangen. Die Zustände entlang beider Pfade werden durch zwei Wellenfunktionen $|\Psi_1\rangle$ und $|\Psi_2\rangle$ charakterisiert. Um die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, dass sich das Molekül im Endzustand befindet, muss das Quadrat der Gesamtwellenfunktion $|\Psi\rangle$ des Moleküls berechnet werden, die sich aus der Summe der beiden einzelnen Wellenfunktionen $|\Psi_1\rangle$ und $|\Psi_2\rangle$ zusammensetzt. Die Wahrscheinlichkeit $|\Psi|^2$ enthält

einen Mischterm, der die Phase zwischen den beiden Wellenfunktionen $|\Psi_1\rangle$ und $|\Psi_2\rangle$ beinhaltet. Folglich kann die Übergangswahrscheinlichkeit, entlang welchen Weges die Reaktion abläuft, durch die Änderung der relativen Phasen zwischen den beiden Wegen kontrolliert werden. Wird ein Kontrollexperiment durchgeführt, ändert sich der ursprüngliche Hamiltonoperator des Systems $H(t)$ sowie die Schrödingergleichung zur Beschreibung der Bewegung $i\hbar\frac{\partial}{\partial t}|\Psi(t)\rangle = H|\Psi(t)\rangle$. Der neue Hamiltonoperator $H'(t) = H(t) + V(t)$ enthält auch die Wechselwirkung des optischen Feldes mit dem elektrischen Dipoloperator $V(t)$ und führt das System zum neuen Zustand $|\Psi'(t)\rangle$. Ohne Kontrolle erreicht das System nicht unbedingt den gewünschten Zielzustand für die spezifische Observable O mit dem Erwartungswert $\langle\Psi(t)|O|\Psi(t)\rangle$. Das Ziel der Kontrolle besteht darin, den neuen Erwartungswert $\langle\Psi'(t)|O|\Psi'(t)\rangle$ für die Observable O innerhalb einer bestimmten Zeitdauer zum gewünschten Zielzustand zu dirigieren. Um das optimale elektromagnetische Feld für das System zu bestimmen, benötigt man eine genaue Kenntnis des Hamiltonians, der aber für die meisten realistischen Systeme nicht bekannt ist. Zudem übersteigt hier die Berechnung des optimalen elektromagnetischen Feldes aus der Lösung der Schrödingergleichung momentan noch die Kapazitäten der Computer, so dass dieser Lösungsansatz zur Kontrolle nur für kleine Modellsysteme angewandt werden kann.

Experimentell lassen sich Kontrollschemas anwenden, sogenannte „kohärente Kontrollexperimente“, deren Konzepte auf der kohärenten Natur der Laserstrahlung beruhen. Insgesamt werden drei verschiedene Kontrollschemas unterschieden, für die es in der Literatur zahlreiche Beispiele der experimentellen Anwendung gibt.

Brumer und Shapiro Das Schema von Brumer und Shapiro [341–348] nutzt Interferenzeffekte in der Zeit- und Frequenzdomäne aus. Laserimpulse, deren Phase variabel angepasst werden kann, regen Wellenpakete entlang verschiedener optischer Pfade an. Diese Pfade münden in den gleichen angeregten Zustand, aus dem die unterschiedlichen Produktpfade gebildet werden können. Dieser angeregte Zustand setzt sich aus einer kohärenten Superposition bzw. Interferenz von mindestens zwei Anregungspfaden zusammen, deren Superposition vom optischen Pfad und von der Anzahl der am Anregungsprozess beteiligten Photonen abhängt. Je nach der relativen Phase zwischen den Laserimpulsen können Pfade konstruktiv interferieren, so dass der gewünschte Produktkanal favorisiert wird. Gleichzeitig können andere Pfade destruktiv interferieren, um Beiträge von unerwünschten Nebenprodukten zu minimieren. Auf diese Art kann ein Wellenpaket durch komplexe mehrdimensionale Potentialflächen zum Zielzustand gesteuert werden. Sowohl die absolute Produktquantenausbeute als auch das Verhältnis von Besetzungszahlen der Zustände können dadurch moduliert und kontrolliert werden. Wenn das zu untersuchende System jedoch komplexer wird, ist es schwierig, die richtigen Parameter einfach abzuschätzen.

Tannor und Rice Ein alternatives Kontrollschema wurde von Tannor und Rice [349–352] vorgeschlagen, die sogenannte „Pump-Dump-Technik“. Dieses Schema ver-

wendet zwei kurze Laserimpulse zur Manipulation der quantenmechanischen Wellenpakete, wobei die Laserimpulse zeitlich kürzer als die interne Energieumverteilung und die kohärenten Zerfallskonstanten im Molekül sind. Der erste Laserimpuls (Pumpimpuls) erzeugt ein vibronisches Wellenpaket aus einer kohärenten Superposition von Schwingungszuständen auf der angeregten Potentialfläche. Das Wellenpaket entwickelt sich in der Zeit ohne Einfluss von außen entsprechend der Form der Potentialfläche. Nach einem geeigneten Zeitintervall, wenn das Wellenpaket einen Ort auf der Potentialfläche erreicht, der bevorzugt mit dem gewünschten Produktzustand assoziiert wird, wird ein zweiter Laserimpuls (Dumpimpuls) eingestrahlt, der die Population in den Grundzustand des gewünschten Produktkanals transferiert. Als Optimierungsparameter stehen allerdings nur die Phasendifferenz und der zeitliche Intervallabstand zwischen Pump- und Dumpimpuls zur Verfügung. Daher stehen für die Anwendung bei komplexeren Systemen zu wenig variierbare Parameter zur Verfügung.

Rabitz et al. Ein allgemeinerer Ansatz wurde von Rabitz et al. [353–358] postuliert, der es ermöglicht, kohärente Kontrolle auch an komplexeren Systemen durchzuführen. Das Experiment besteht aus der Kombination eines Femtosekunden-Lasersystems und eines computergesteuerten Impulsformers, der spezielle maßgeschneiderte elektromagnetische Felder zur Anregung des Systems erzeugen kann. Als Kontrollparameter für die maßgeschneiderten Impulse stehen zahlreiche Variable zur Verfügung, wie z. B. die Amplituden und die Phasen jeder einzelnen spektralen Komponente im optischen Kontrollfeld. Im **open-loop**-Verfahren wird zunächst ein beliebiges Kontrollfeld als Testfunktion auf das quantenmechanische System eingestrahlt, das photophysikalische oder photochemische Prozesse in Gang setzt. Die Entwicklung des Systems wird beobachtet und die Antwort des Systems, die beispielsweise aus der Quantenausbeute eines Photoprodukts oder ähnlichem bestehen kann, mit Hilfe eines geeigneten Sensors detektiert. Dann wird das Kontrollfeld modifiziert, um noch bestehende Abweichungen vom gewünschten Zielzustand zu minimieren, und wiederum die Antwort des Systems aufgenommen. Durch Wiederholung dieses Prozederes kann ein optimiertes Kontrollfeld gefunden werden.

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung des optimalen Kontrollfeldes bietet das sogenannte **closed-loop**-Verfahren, das die experimentelle Systemantwort unter Verwendung eines Suchalgorithmus direkt in Form einer Rückkopplungsschleife in die nächste Modifikation des Kontrollfeldes einfließen lässt. Der Algorithmus probiert eine große Anzahl von Testkontrollfeldern am quantenmechanischen System aus und evaluiert, wie gut der jeweilige Kontrollimpuls in der Lage ist, das System zum gewünschten Zielzustand zu führen. Aus der Information der experimentellen Antwort bzw. Rückkopplungssignale des Systems werden neue modifizierte und verbesserte Testkontrollfelder bestimmt, die wiederum am System ausprobiert werden und erneut evaluiert werden. Diese Schleife wird solange iterativ durchlaufen, wobei eine ständige Anpassung des Kontrollfeldes erfolgt, bis sich das System möglichst nah

am Zielzustand befindet. Mit dieser Methode kann das System selbst das optimale Kontrollfeld finden, ohne dass irgendwelche a priori Informationen über molekulare Potentialflächen oder den Reaktionsmechanismus erforderlich sind. Das quantenmechanische System löst eigenständig ohne weitere Näherungen die Schrödingergleichung des Systems.

Als Suchalgorithmen stehen zwei verschiedene Konzepte zur Verfügung, genetische Algorithmen und evolutionäre Strategien [359]. Dabei werden zuerst alle Individuen (initiale Laserimpulsformen) einer Generation am System (Molekül) getestet. Nur diejenigen Individuen haben eine größere Chance zu überleben, die besser als ihre Konkurrenten an ihre Umgebung angepasst sind, d. h. die eher das Kontrollziel erreichen. Dies führt zu einer natürlichen Selektion. Für die Reproduktion werden die Besten ausgewählt, deren genetisches Material (Einstellungsparameter am Impulsformer) durch Crossing-over oder Mutation neu kombiniert wird. Die Nachkommenschaft weist eine bessere Anpassung an ihre Umgebung auf. Durch Wiederholung dieser Prozedur über mehrere Generationen erhöht sich die gemittelte Fitness, bis der Algorithmus konvergiert und das Optimierungsziel erreicht ist.

Allerdings ergeben sich bereits für sehr kleine Molekülsysteme derart komplexe Laserfelder im Optimierungsprozess, dass sie nicht mehr adäquat interpretiert werden können, um Rückschlüsse auf das Molekül zu ziehen. Daher wählt man einfachere Impulsformen zur Optimierung, indem man Impulszüge mit variablem Zeitabstand oder linear gechirpte Impulse verwendet. Der lineare Chirp in einem Impuls gibt die lineare Abhängigkeit der Frequenz als Funktion der Zeit an.

Im folgenden wird ein kohärentes Kontrollexperiment am Laserfarbstoff Oxazin 1 dargestellt, wobei der lineare Chirp im Anregungsimpuls mit Hilfe eines Impulsformers variiert wurde und dessen Einfluss auf die Wellenpaketsbewegungen untersucht wurde. Dabei konnte ein optimaler Chirpparameter von -0.75 ± 0.2 fs/nm bestimmt werden, mit dem effizient Wellenpakete im Grundzustand generiert werden, so dass mittels kohärenter Kontrolle ein definierter Zielzustand mit einem optimierten Wellenpaket erreicht werden konnte.

6.2 Oxazin 1

Um den experimentellen Ansatz der kohärenten Kontrolle zuerst an einem einfachen Modell zu verifizieren, wurden erste Messungen am Modellsystem Oxazin 1 in Methanol durchgeführt. Die probentechnische Handhabung und insbesondere die wesentlich geringere Komplexität der Signalbeiträge erleichtern die Realisierung der Messungen und favorisieren Oxazin. Dabei wurde der lineare Chirp im Anregungsimpuls mit Hilfe eines Impulsformers variiert und der Einfluss des linearen Chirps auf die Wellenpaketsbewegungen untersucht.

Das Molekül Oxazin 1 (3-Diethylamino-7-diethyliminophenoxazonium Perchlorat)

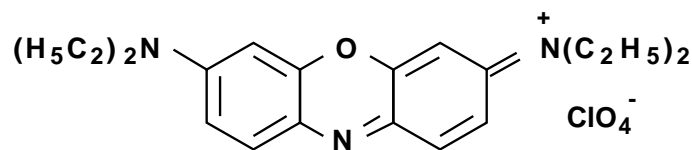


Abbildung 6.1: Chemische Strukturformel von Oxazin 1 in dissoziierter Form mit Perchlorat

wurde für Farbstofflaser in einem Wellenlängenbereich zwischen 690 nm und 780 nm verwendet. Die chemische Struktur ist in Abb. 6.1 dargestellt: Das Molekül besteht aus zwei Benzolringen, die über eine Etherverbindung und eine Aminoverbindung verknüpft sind, über die sich ein delokalisiertes π -Elektronensystem ausbildet. An den Enden ist jeweils ein Aminoethylrest gebunden. Oxazin erweist sich u. a. als ein interessantes Molekül, da es einen sehr schnellen intermolekularen Elektronentransfer mit einer Zeitkonstante von 20 fs bis 80 fs durchführt [306, 360–363], wenn ein geeigneter Elektronendonator im direkten Kontakt vorhanden ist. In Methanol allerdings findet kein ultraschneller Elektronentransfer statt. In diesem Fall relaxiert Oxazin aus dem angeregten Zustand durch Fluoreszenz und nichtstrahlende Prozesse in den elektronischen Grundzustand. Die Fluoreszenz zerfällt innerhalb von etwa einer Nanosekunde mit einer Quantenausbeute von 11 % [364].

Im Molekül treten als dominante Schwingungen Moden bei 560 cm^{-1} und 609 cm^{-1} auf. Diese beiden Ringmoden können einer N-O-Biegeschwingung bei 560 cm^{-1} und einer O-Biegeschwingung bei 609 cm^{-1} zugeordnet werden [306]. Da inzwischen Laserimpulse von einigen 10 fs zur Verfügung stehen, besteht die Möglichkeit molekulare Schwingungen bis zu 2000 cm^{-1} in Echtzeit mit Hilfe von transients Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich zu beobachten. In Oxazin können Oszillationen in Form von Wellenpaketsbewegungen mit einer Dephasierung von Piko- bis Nanosekunden detektiert werden.

In Abb. 6.2 a) sind das stationäre Absorptions- und Emissionsspektrum von Oxazin dargestellt. Die Absorption erstreckt sich von 520 nm bis 690 nm mit einem Maximum bei 643 nm. Die Emission liegt mit einem Stokes-shift von ca. 30 nm rotverschoben zur Absorption. Dementsprechend wurden die Spektren von Anregungs- und Abtastimpulsen für das kohärente Kontrollexperiment gewählt (Abb. 6.2 b)): der Anregungsimpuls wies eine zeitliche Dauer von 13 fs bei einer Zentralwellenlänge von 570 nm auf und der Abtastimpuls war auf 15 fs bei einer Wellenlänge von 650 nm komprimiert. Das transiente Absorptionssignal wurde als Funktion des linearen Chirps im Anregungsimpuls aufgenommen. Dabei wurde der lineare Chirp mit Hilfe eines Impulsformers in einem Bereich von -2 fs/nm bis 1 fs/nm variiert ohne Veränderungen an höheren Chirpordnungen vorzunehmen. Somit konnte eindeutig der Einfluss des linearen Chirps auf die Oszillationen im Molekül untersucht werden. Das Ziel des kohärenten Kontrollperiments bestand in der Optimierung der Wel-

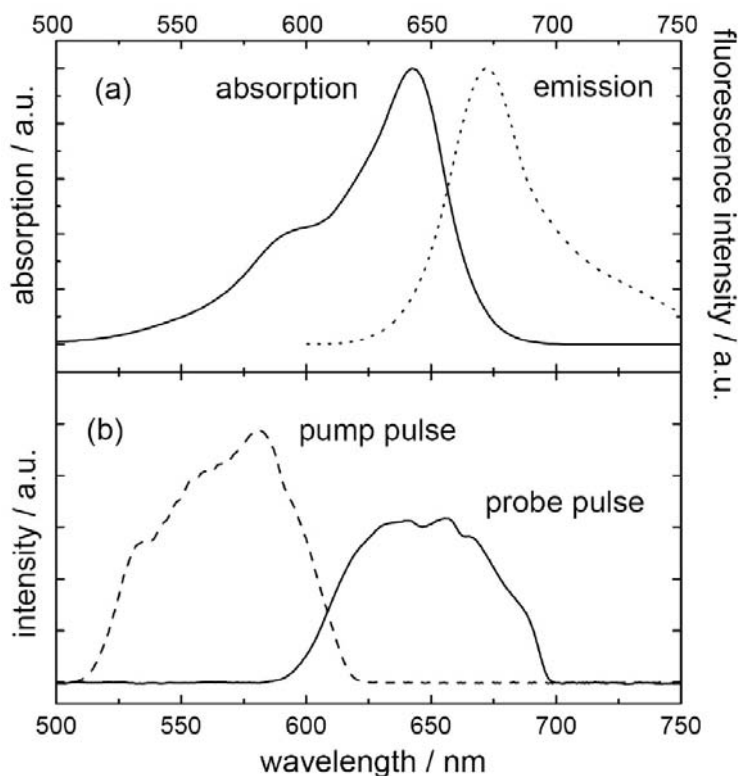


Abbildung 6.2: a) Stationäres Absorptions- und Emissionsspektrum von Oxazin 1. b) Spektren vom Anregungsimpuls mit einer Impulsdauer von 13 fs bei 570 nm und Abtastimpuls mit einer Impulsdauer von 15 fs bei 650 nm.

lenpaketsbewegungen im Grundzustand durch Variation des linearen Chirps. Die Erzeugung eines Wellenpakets im elektronischen Grundzustand kann durch einen impulsiven resonanten Ramanprozess beschrieben werden. Zunächst bewirkt die Wechselwirkung des Anregungsimpulses mit dem Molekül eine kohärente Polarisation vom angeregten Zustand und dem Grundzustand und transferiert die Wellenfunktion des Grundzustands in den angeregten Zustand. Das dort generierte Wellenpaket bewegt sich nach der Hamiltonfunktion auf der Potentialfläche, bis eine zweite Wechselwirkung, die durch zeitlich getrennte Spektralanteile des gleichen Anregungsimpulses zustandekommt, das Wellenpaket in den elektronischen Grundzustand projiziert. Damit wird der Grundzustand mit einem nun phasenverschobenen Wellenpaket bevölkert. Der Erzeugungsprozess des Grundzustandswellenpakets hängt vom Chirp im Anregungsimpuls ab. Im folgenden wird darauf eingegangen, welchen Einfluss der lineare Chirp im Anregungsimpuls auf die Generierung eines Grundzustandswellenpakets ausübt.

Das Wellenpaket propagiert zwischen den beiden Wechselwirkungen, die während der zeitlichen Dauer des Anregungsimpulses stattfinden, im angeregten Zustand. Das

Zeitintervall zwischen den beiden Wechselwirkungen bestimmt die Energie für den Übergang. Die zweite Wechselwirkung und damit die Projektion in den Grundzustand kann verstärkt werden, indem ein negativ gechirpter Anregungsimpuls (blaue Wellenlängen erscheinen vor roten Wellenlängen) verwendet wird. Der Energieabstand zwischen dem angeregten Zustand und dem Grundzustand verringert sich, so dass bei einem negativ gechirpten Anregungsimpuls die passende Wellenlänge zum richtigen Zeitpunkt für den Übergang angeboten wird. Im Grundzustand findet eine kohärente Überlagerung der Wellenfunktionen der einzelnen Schwingungsniveaus statt, die zu einem Wellenpaket mit großer Amplitude führt. Damit sollte ein negativ gechirpter Anregungsimpuls die Generierung eines Grundzustandswellenpakets begünstigen.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

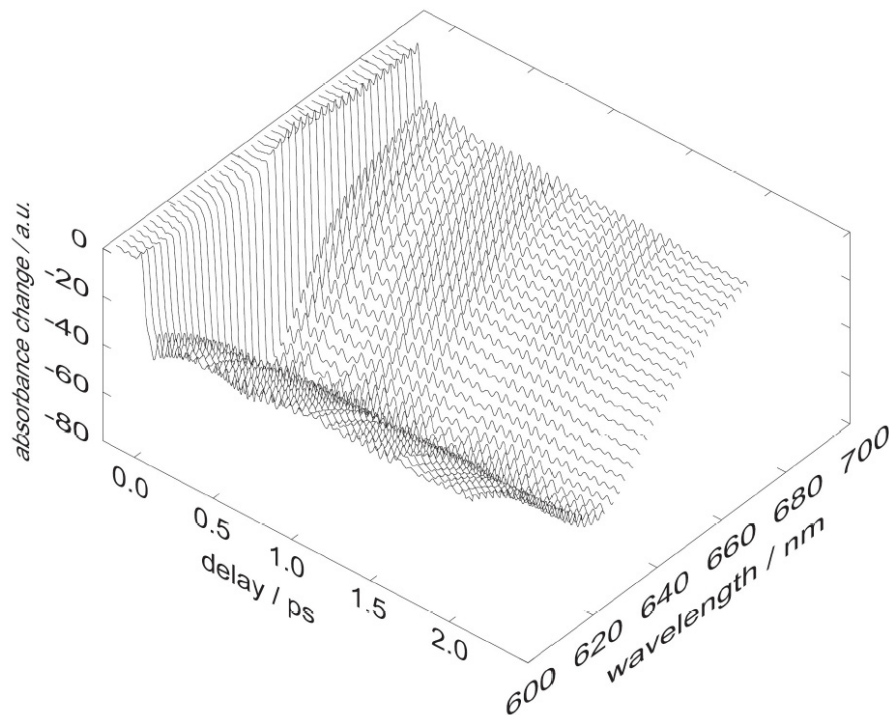


Abbildung 6.3: Dreidimensionale Darstellung des transienten Absorptionssignals von Oxazin 1 als Funktion der Abtastwellenlänge von 600 nm bis 690 nm und der Verzögerungszeit von -0.1 ps bis 2.1 ps. Auf dem transienten Absorptionssignal sind deutliche Oszillationen mit einer Periode von ca. 60 fs zu sehen.

Eine typische Messung des transienten Absorptionssignals ist in Abb. 6.3 dargestellt. Die Absorptionsänderung ist in Abhängigkeit der Abtastwellenlänge und der Verzögerungszeit aufgetragen. Am Zeitnullpunkt erfolgt in der transienten Absorption ein

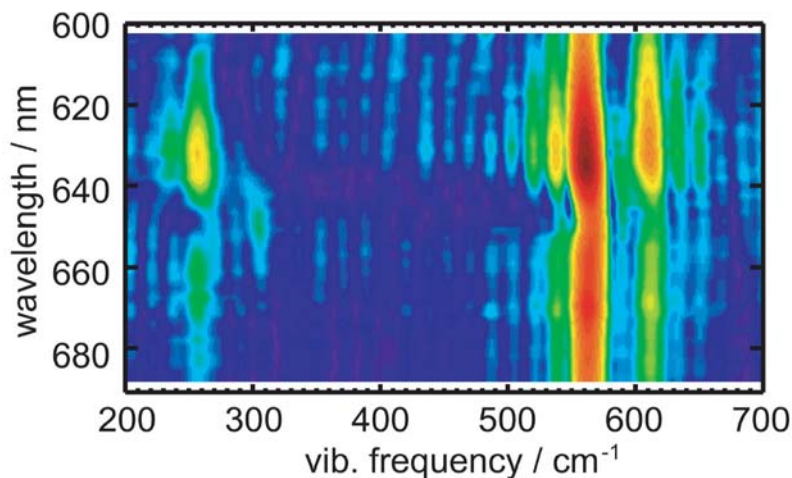


Abbildung 6.4: Der Betrag der komplexen Fourieramplitude ist gegen die Abtastwellenlänge und die Schwingungsfrequenz aufgetragen. Es lassen sich zwei dominante Moden identifizieren, die um 560 cm^{-1} und 609 cm^{-1} lokalisiert sind.

negatives Absorptionssignal (Ausbleichen des Grundzustandes) über den gesamten Bereich der Abtastwellenlängen mit einem Maximum bei ca. 645 nm. Das spektral integrierte Ausbleichen zeigt keine Zerfallskinetik und bleibt über den dargestellten Bereich von 0 ps bis 2.1 ps konstant. Auf dem Signal erscheinen Oszillationen durch angeregte Schwingungsmoden mit einer Periode von etwa 60 fs. Dazu wurde für jeden Parameter Φ des linearen Chirps¹ im Anregungsimpuls ein solches transientes Absorptionssignal aufgenommen. Die Oszillationen auf dem transienten Signal konnten für unterschiedliche Anregungsimpulse mit linearem Chirp beobachtet werden, deren Chirpparameter Φ sich im Bereich zwischen -1.2 fs/nm und 0.2 fs/nm befand. Zur quantitativen Analyse der beteiligten Schwingungsmoden wurde das Messsignal fouriertransformiert und das Fourierspektrum für jeden Chirpparameter Φ bestimmt. Das genauere Verfahren zur Berechnung des Fourierspektrums kann im Abschnitt 3.6 der Datenauswertung oder in [323, 365, 366] nachgelesen werden. Das Fourierspektrum, das zum transienten Absorptionssignal in Abb. 6.3 gehört, ist in Abb. 6.4 dargestellt.

Der Einfluss des linearen Chirps kann qualitativ direkt in der transienten Absorptionssmessung beobachtet werden. In Abb. 6.5 wird das transiente Absorptionssignal bei einer Abtastwellenlänge von 637 nm für zwei Werte des Chirpparameters Φ , $\Phi = +0.5\text{ fs/nm}$ und $\Phi = -0.5\text{ fs/nm}$, verglichen. Es ist deutlich erkennbar, dass ein negativer Chirp im Anregungsimpuls zu einer größeren Amplitude der Oszillationen im Signal führt. Diese Beobachtung stimmt auch mit den vorherigen Überlegungen zur Erzeugung eines Grundzustandswellenpakets mit gechirpten Anregungsimpulsen

¹Definition des linearen Chirps: Der lineare Chirp in einem Impuls gibt die lineare Abhängigkeit der Frequenz als Funktion der Zeit an.

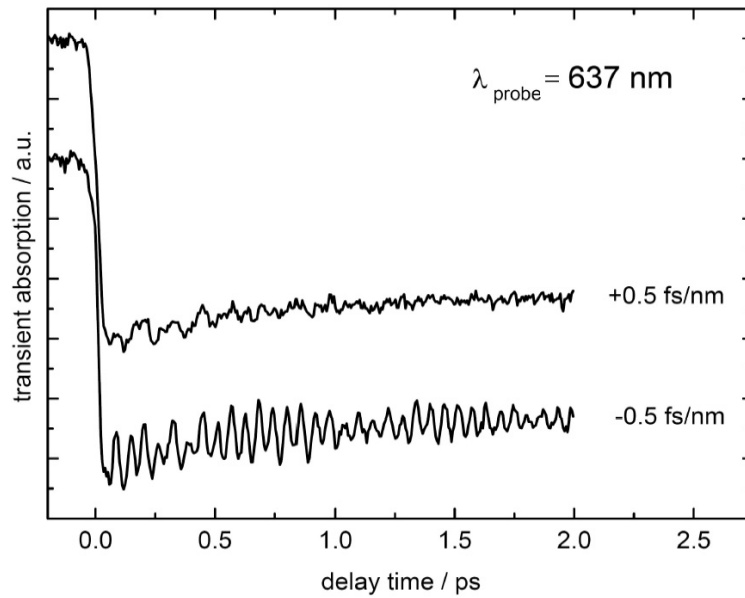


Abbildung 6.5: Das transiente Absorptionssignal ist bei einer Abtastwellenlänge von 637 nm für jeweils zwei verschiedene Chirpeinstellungen, einen positiven Chirp von +0.5 fs/nm und einen negativen Chirp von -0.5 fs/nm, dargestellt. Die Oszillationen für den positiven Chirp sind deutlich reduziert, während für den negativen Chirp das Optimum gefunden wurde.

überein. Ein positiver Chirp dagegen reduziert die Oszillationen.

Genauer lässt sich diese Beobachtung in den Fourieramplituden quantifizieren. Die Fourieramplituden der stärksten Mode 560 cm^{-1} sind für die Abtastwellenlängen 637 nm, 631 nm und 624 nm in Abhängigkeit des linearen Chirpparameters Φ in Abb. 6.6 abgebildet. Die Fourieramplitude dieser Mode weist eine gaussförmige Abhängigkeit vom linearen Chirpparameter mit einem leicht asymmetrischen Verhalten auf. Durch eine Anpassung der Messpunkte mit einer Gaussfunktion kann als optimaler linearer Chirpparameter ein Wert von $-0.36 \pm 0.1 \text{ fs/nm}$ ermittelt werden, der die Erzeugung von Grundzustandswellenpaketen optimieren kann. Die Abhängigkeit der Mode 609 cm^{-1} vom linearen Chirpparameter ist in Abb. 6.7 dargestellt, wobei die schwarzen Quadrate die Fourierdaten direkt aus der Messung repräsentieren. Diese Mode zeigt ebenfalls ein asymmetrisches Verhalten, das sich folgendermaßen erklären lässt:

Höhere Ordnungen von Chirp können für dieses asymmetrische Verhalten nicht verantwortlich sein, da durch den experimentellen Aufbau mit einem Impulsformer nur die quadratische Phase manipuliert wurde. Ferner können höhere Ordnungen von Chirp eindeutig durch die Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsmessungen für jeden Chirpparameter Φ ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 3).

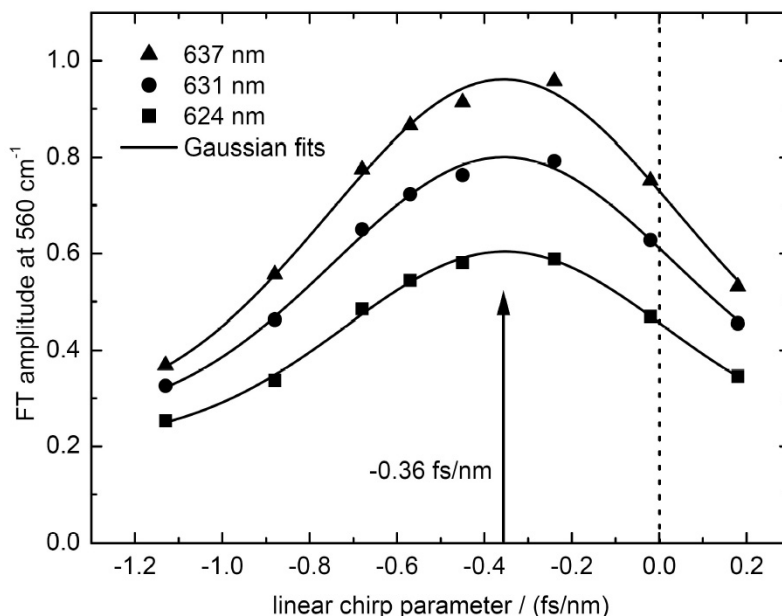


Abbildung 6.6: Für die dominante Mode 560 cm^{-1} ist die Fourieramplitude für die verschiedenen Abtastwellenlängen 637 nm, 631 nm und 624 nm in Abhängigkeit vom linearen Chirpparameter dargestellt. Eine Anpassung der Messpunkte mit einer Gaussfunktion ermöglicht es, einen Wert zur Abschätzung des optimalen Chirpparameter zu bestimmen: -0.36 fs/nm .

Die Variation des linearen Chirps übt auf die Amplitude einer Schwingungsmode im Fourierspektrum einen Einfluss aus, der von zwei wichtigen Aspekten abhängt. Einerseits verursacht ein Chirp im Anregungsimpuls eine zeitliche Verbreiterung dieses Impulses, so dass auch die Kreuzkorrelationsbreite, die die zeitliche Auflösung des transienten Absorptionsexperiments bestimmt, zunimmt. Durch die geringere Zeitauflösung können die Schwingungsmoden nicht mehr so gut aufgelöst werden, was eine Abnahme der Fourieramplitude dieser Mode zur Folge hat. Andererseits kann, wie oben gezeigt wurde, ein negativer Chirp im Anregungsimpuls die Wellenpaketsbewegung optimieren und damit zu einer größeren Fourieramplitude der Mode führen. Diese beiden Effekte konkurrieren miteinander, so dass der experimentell gefundene optimale Chirpparameter Φ von -0.36 fs/nm denjenigen Wert angibt, der sich aufgrund von optimierter Wellenpaketserzeugung und reduzierter Zeitauflösung ergibt.

Um allerdings den Chirpparameter Φ zu bestimmen, der nur für die Optimierung der Wellenpaketsbewegung verantwortlich ist, muss das Fourierspektrum bezüglich der reduzierten Zeitauflösung korrigiert werden.

Für die Korrektur wurden die Berechnungen in [367] herangezogen, die den quantitativen Einfluss von gechirpten Anregungs- und Abtastimpulsen auf das transiente Absorptionssignal berücksichtigen. Die Signaländerung des Systems wurde dabei über

die nichtlineare Polarisation dritter Ordnung berechnet. Die Dämpfung der Schwingungsmode ist durch die Parameter des Anregungsimpulses bestimmt. Eine genauere Beschreibung der Methode zur Korrektur des linearen Chirpparameters findet sich in [366]. Anhand dieser Berechnung wurden der Effekt der Zeitauflösung in den gemessenen chirpabhängigen Daten (Abb. 6.6) sowie die Daten (Abb. 6.7 Messpunkte mit schwarzen Quadraten) als Funktion des Chirps korrigiert. Die korrigierten Daten sind in Abb. 6.7 mit offenen Kreisen veranschaulicht, wobei die Fourieramplitude in Abhängigkeit vom Chirp für die Mode 560 cm^{-1} (oben) und 609 cm^{-1} (unten) dargestellt ist. Sie geben den Einfluss des linearen Chirps im Anregungsimpuls auf die Optimierung eines Grundzustandswellenpakets an.

Ohne Korrektur zeigen beide Moden ein asymmetrisches Verhalten in Abhängigkeit

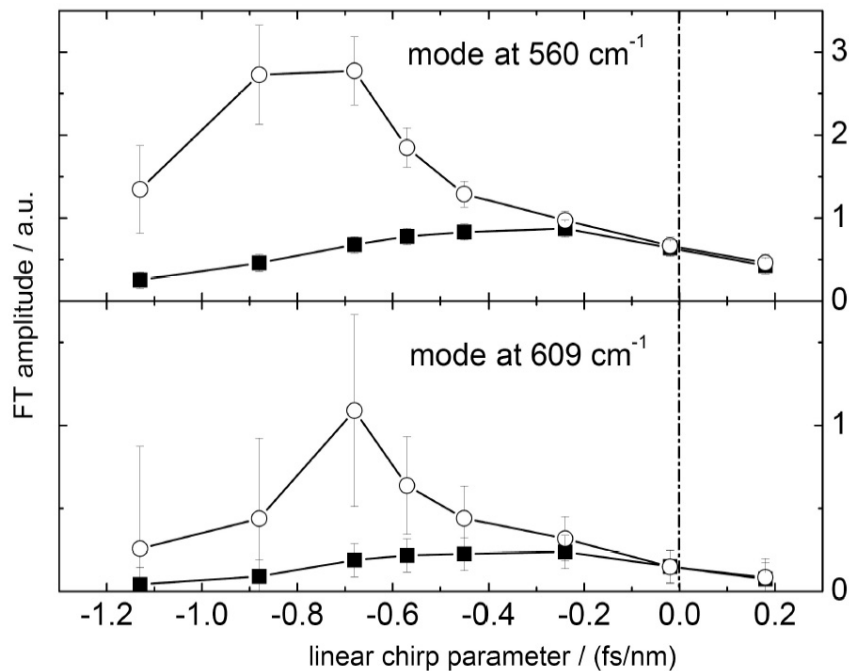


Abbildung 6.7: Die beiden Fourieramplituden der beiden Moden 560 cm^{-1} (oben) und 609 cm^{-1} (unten) sind in Abhängigkeit des Chirpparameters aufgetragen. Die schwarzen Quadrate zeigen die Fourieramplitude direkt von der Fouriertransformation der Messdaten, während die offenen Kreise die Daten visualisieren, die bezüglich der reduzierten zeitlichen Auflösung korrigiert wurden. Für beide Moden ergibt sich als optimaler Chirpparameter ein Wert von $-0.75 \pm 0.2\text{ fs/nm}$, um ein Wellenpaket im Grundzustand zu erzeugen.

vom linearen Chirpparameter im Anregungsimpuls (schwarze Quadrate in Abb. 6.7), wobei sich jeweils ein optimaler Chirpparameter von -0.36 fs/nm ergibt. Die Korrektur der beiden Moden hinsichtlich der Zeitauflösung liefert als optimalen Chirpparameter Φ_{corr} einen Wert von etwa $-0.75 \pm 0.2\text{ fs/nm}$. Ein Anregungsimpuls mit diesem negativen linearen Chirp ($\Phi_{corr} = -0.75 \pm 0.2\text{ fs/nm}$) kann Oszillationen, d.

h. Grundzustandswellenpakete, noch intensiver erzeugen als ein transformlimitierter Anregungsimpuls.

Dieser negative Chirpparameter unterstützt die Zuordnung der Moden als Grundzustandswellenpakete. Bisher waren Wellenpaketsbewegungen im Grundzustand von Oxazin 1 nur in einem Spektralbereich zwischen 625 nm und 660 nm nachgewiesen worden [360, 363]. In anderen Spektralbereichen konnte bis jetzt noch keine eindeutige Zuordnung der Oszillationen getroffen werden. Die hier beobachteten Oszillationen zeigen zum ersten Mal, dass Wellenpaketsbewegungen im Grundzustand auch in einem wesentlich größeren Spektralbereich (600 nm bis 700 nm) auftreten.

Der experimentell bestimmte lineare Chirpparameter $\Phi_{corr} = -0.75 \pm 0.2$ fs/nm stellt denjenigen Chirpparameter dar, der zu einer Optimierung der Wellenpaketsbewegung im Grundzustand führt. Dieser experimentell gewonnene Wert für den Chirpparameter Φ soll nun unabhängig überprüft werden, indem eine Abschätzung, basierend auf einem vereinfachten Modell, vorgenommen wird.

Das Modell besteht aus zwei Potentialflächen, dem Grundzustand (GS in Abb. 6.8) und dem ersten angeregten Zustand (ES in Abb. 6.8) mit ihren jeweiligen Schwingungsniveaus. Zunächst findet eine Anregung aus dem Grundzustand (GS) in den angeregten Zustand (ES) statt (der Übergang ist durch den Pfeil ① in Abb. 6.8) gekennzeichnet), in dem ein Wellenpaket erzeugt wird. Damit sich das Wellenpaket

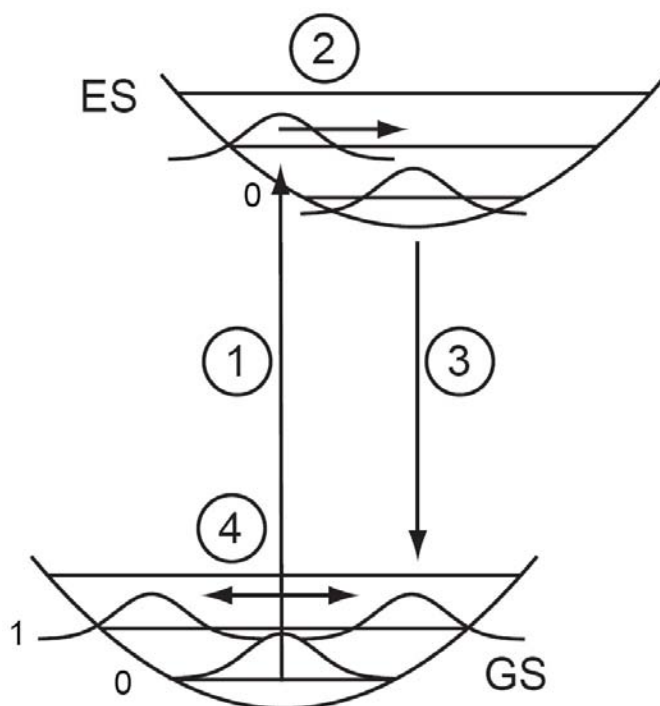


Abbildung 6.8: Schema für die Erzeugung eines Grundzustandswellenpakets.

gut in den Grundzustand transferieren lässt, müssen sich die beiden Wellenfunktionen des angeregten Zustands und des Grundzustands optimal überlappen. Das Minimum der S_1 -Potentialfläche wird nach einem Viertel der Schwingungsperiode erreicht (Übergang ② in Abb. 6.8). Demnach sollte die Übergangsfrequenz der zweiten Wechselwirkung rotverschoben in der Frequenz sein. Betrachtet man die Mode 560 cm^{-1} , die einer Schwingungsperiode von 60 fs entspricht, so erreicht das Wellenpaket im angeregten Zustand nach 15 fs das Potentialminimum. Die notwendige Wellenlängenverschiebung ergibt sich näherungsweise aus der Differenz des 0-0 Übergangs bei 642 nm (Übergang ① in Abb. 6.8) und des 0-1 Übergangs (Übergang ③ in Abb. 6.8), der eine Blauverschiebung um 560 cm^{-1} bei 620 nm erfährt. Aus diesen beiden Werten lässt sich der resultierende optimale negative Chirpparameter Φ_{est} bestimmen, der einen Wert von $15\text{ fs}/22\text{ nm} = -0.68\text{ fs/nm}$ annimmt. Vergleicht man diesen geschätzten Wert Φ_{est} mit dem korrigierten optimalen Chirpparameter $\Phi_{corr} = -0.75\text{ fs/nm}$, so zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Werte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das beobachtete Wellenpaket eindeutig aus dem Grundzustand stammt und vorzugsweise über einen impulsiv resonanten Ramanprozess erzeugt wird.

6.4 Zusammenfassende Bemerkung

In diesem Kapitel wurden erste kohärente Kontrollexperimente durchgeführt, die als Vorbereitung zur Reaktionskontrolle von Bakteriorhodopsin dienen. Hier wurde ein solches Experiment zum ersten Mal an Oxazin 1 beschrieben, in dem als Kontrollziel die Optimierung von Grundzustandswellenpaketen mit Hilfe linear gechirpter Anregungsimpulse gewählt wurde.

Die experimentelle Durchführung wurde mit Hilfe von Pump-Probe-Spektroskopie in transientser Absorption realisiert, an die hohe Anforderungen bezüglich der Zeitauflösung gestellt waren, um die Oszillationen aufzulösen. In den hier präsentierten Experimenten wurde eine sehr gute Zeitauflösung von 25 fs erreicht. Die Variation des Chirps erfolgte erstmals mit Hilfe eines Impulsformers, der eine gezielte Manipulation der Anregungsimpulse ermöglichte. Die Einstellung des linearen Chirps konnte dadurch ohne Veränderung höherer Chirpordnungen, wie dies bei Verwendung von Prismenkompressoren auftritt [368, 369], gewährleistet werden. Somit konnte zum ersten Mal eindeutig nur der Einfluss des linearen Chirps auf die Oszillationen im Molekül untersucht werden.

In diesem Experiment gelang es zum ersten Mal, einen optimalen Chirpparameter Φ von $-0.75 \pm 0.2\text{ fs/nm}$ zu bestimmen, mit dem effizient Wellenpakete im Grundzustand generiert wurden. Dieser experimentelle Wert für den optimalen Chirpparameter Φ konnte auch durch theoretische Überlegungen bestätigt werden.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die photochemische Primärreaktion des Retinalchromophors in bakteriellen Retinalproteinen untersucht. Mit Hilfe der Ultrakurzzeitspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich, in Form von Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie, konnte diese im Femto- und Pikosekundenbereich ablaufende Reaktion im Detail analysiert werden.

Das Archaeon *Halobacterium salinarum* enthält u. a. die beiden Retinalproteine Bakteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR). Obwohl BR und HR über eine sehr ähnliche Struktur verfügen, unterscheiden sie sich sowohl in ihrer Primärreaktion als auch in ihrer biologischen Funktion als lichtgetriebene Protonen- bzw. Chloridionenpumpe. Der wichtigste strukturelle Unterschied ist durch das Gegenion zum Retinal an der Position 85 gekennzeichnet (Aspartat (D) in BR).

Daher wurden zeitaufgelöste Absorptionsexperimente an BR (Gegenion, Aspartat (D)) und HR (fehlendes Gegenion, Threonin (T)) durchgeführt, um den Einfluss der Proteinumgebung auf die Primärreaktion zu bestimmen.

Um die Primärreaktion von BR und HR unter identischen nativen Bedingungen miteinander vergleichen zu können, war es notwendig, die Primärreaktion von HR unter nativen physiologischen Bedingungen zu charakterisieren, was in den hier vorgestellten Messungen zum ersten Mal durchgeführt wurde.

Die Verwendung der BR-Mutante D85T erlaubt es durch Änderung des pH-Werts und der Salzkonzentration gezielt die Ladung an der Position 85, die sich in der Nähe der Schiffchen Base des Retinals befindet, zu variieren. In dieser Arbeit wurde erstmals die Primärreaktion der BR-Mutante D85T charakterisiert, wobei die Primärreaktion bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen spektroskopiert wurde. Damit wurde der letzte fehlende noch nicht untersuchte Zeitbereich im Photozyklus (unter einer Nanosekunde) aufgeklärt, so dass der Photozyklus der BR-Mutante D85T nun vollständig bekannt ist.

Der Einfluss der Proteinumgebung auf die Primärreaktion im Femto- und Pikosekundenbereich ist folgendermaßen korreliert: Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass nur wenn ein Anion (Chloridion) exakt in einem eingeschränkten Bereich um die Position 85 lokalisiert ist, eine BR-ähnliche stationäre Absorption und eine schnelle Primärreaktion mit der BR-typischen Zeitkonstante von 0.5 ps hervorgerufen wird. Fehlt dagegen das Anion oder befindet es sich außerhalb dieses eingeschränkten Bereichs, wird eine langsame Primärreaktion analog zur Primärreaktion von HR erzeugt. Dabei findet eine Verzweigung im angeregten Zustand statt, der mit einer biexponentiellen Kinetik von 1 ps bis 10 ps zerfällt.

Zusätzlich wurden die initialen Bewegungen im angeregten Zustand von BR untersucht, indem erstmals die Auswirkung der Anregungsdichten auf die Fluoreszenzdynamik analysiert wurde:

Bei Anregungsdichten mit mehr als einem Photon pro BR-Molekül treten sowohl spektrale als auch dynamische Änderungen in der Fluoreszenz auf, die Mehrphotonenprozessen zugeordnet werden können. Diese Mehrphotoneneffekte können zum ersten Mal bestehende Diskrepanzen in der Literatur bezüglich der Primärreaktion von BR erklären.

Nur für Anregungsdichten unterhalb eines Photons pro BR-Molekül sind lineare und native Anregungsbedingungen gewährleistet. Unter solchen Bedingungen ergibt sich ein näherungsweise biexponentielles Verhalten, das mit den Zeitkonstanten <0.15 ps und 0.45 ps beschrieben werden kann. Dabei konnte außerdem erstmals ein dynamischer Stokesshift, (eine Rotverschiebung der Fluoreszenzmaxima in der Zeit) beobachtet werden. Die Verschiebung vollzieht sich mit einer charakteristischen Zeit von <0.15 ps, die auf einen schnellen Umordnungsprozess auf der reaktiven Potentialfläche hindeutet.

Ferner wurde der erste schnelle Prozess (<200 fs) mit Hilfe transientser Absorptionsspektroskopie an BR sowie an den BR-Mutanten D85T im grünen Spektralbereich untersucht. Dabei wurde BR am isosbestischen Punkt bei 534 nm im Detail analysiert, was zu einer genaueren Charakterisierung des ersten Prozesses (<200 fs) führte. Bei dieser Wellenlänge wurde die Bildung und Auswirkung eines spektralen Loches beobachtet. Damit ergibt sich dort das folgende Verhalten: Zuerst wird die Absorption aus dem angeregten Zustand (ESA) sichtbar, die instantan mit der Anregung auftritt. Das Ausbleichen des Grundzustandes erscheint mit ca. 50 fs verzögert. Daran schließt sich der dynamische Stokesshift an.

Zuletzt wurden Experimente zur kohärenten Kontrolle an BR, die zur Manipulation der Primärreaktion dienen, vorbereitet. Ein solches kohärentes Kontrollexperiment kann Aufschluss geben, welche Schwingungsmoden entscheidend zur Isomerisierungsreaktion des Retinals beitragen. Theoretische Simulationen eines Kontrollexperimentes am BR-verwandten Rhodopsin zeigen, dass die Kontrolle der Isomerisierungsreaktion realisierbar ist [370, 371].

Als Vorbereitung wurde ein kohärentes Kontrollexperiment am Modellsystem Oxazin 1 mit Hilfe transientser Absorptionsspektroskopie realisiert. Um die im Molekül beteiligten Schwingungsmoden aufzulösen, war eine sehr hohe Zeitauflösung erforderlich, für die in den hier präsentierten Experimenten ein sehr guter Wert von 25 fs erreicht wurde.

Als Kontrollziel diente die Optimierung der Grundzustandswellenpakete mit Hilfe linear gechirpter Anregungsimpulse. Der lineare Chirp im Anregungsimpuls wurde durch einen computergesteuerten Impulsformer variiert. Diese experimentelle Methode ermöglichte es, gezielt nur den Einfluss des linearen Chirps auf die Wellenpakete im Molekül zu beobachten. Für die beiden dominanten Schwingungsmoden bei 560 cm^{-1} und 609 cm^{-1} konnte ein optimaler Chirpparameter Φ von -0.75 ± 0.2 fs/nm gefun-

den werden, der in der Lage ist, effizient Wellenpakete im Grundzustand zu erzeugen. Dieser experimentell bestimmte Wert Φ konnte durch eine vereinfachte theoretische Modellbetrachtung bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Mit freundlicher Genehmigung des National Eye Institute: National Institutes of Health, 2006. <http://www.nei.nih.gov/photo/eyean/> (9 Nov. 2006). 1
- [2] R. Rodieck. *The First Steps in Seeing*. Sinauer Associates, Massachusetts, 1998. Mit freundlicher Genehmigung des Verlags. 2
- [3] Mit freundlicher Genehmigung von Ph.D Paul A. Hargrave, 2006. <http://www.phys.ufl.edu/avery/course/3400/vision/photoreceptor.jpg> (9 Nov. 2006). 3
- [4] T. Yoshizawa and G. Wald. Prelumirhodopsin and the bleaching of the visual pigments. *Nature*, 197:1279–1286, 1963. 2
- [5] G. Wald. Carotenoids and the visual cycle. *J. Gen. Physiol.*, 19:351–371, 1935. 3
- [6] O. Beja, L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich, and E. F. DeLong. Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science*, 289:1902–1906, 2000. 3, 7
- [7] Y. A. Ovchinnikov. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure - function relationships. *FEBS Lett.*, 148:179–191, 1982. 3
- [8] J. B. C. Findlay and D. J. C. Pappin. The opsin family of proteins. *Biochem. J.*, 238:625–642, 1986. 3
- [9] R. Mathies, S. O. Smith, and I. Palings. *Biological Applications of Raman Spectroscopy: Vol.2 Resonance Raman Spectra of Polyenes and Aromatics*, chapter Determination of Retinal Chromophore Structure in Rhodopsins, pages 59–108. Wiley & Sons, Inc., 1987. 3
- [10] G. F. X. Schertler, C. Villa, and R. Henderson. Projection structure of rhodopsin. *Nature*, 362:770–772, 1993. 3
- [11] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, and M. Miyano. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science*, 289:739–745, 2000. 3

- [12] J. L. Spudich, C.-S. Yang, K.-H. Jung, and E. N. Spudich. Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 16:365–392, 2000. 3
- [13] R. E. Stenkamp, S. Filipek, C. A. G. G. Driessen, D. C. Teller, and K. Palczewski. Crystal structure of rhodopsin: a template for cone visual pigments and other G protein-coupled receptors. *BBA*, 1565:168–182, 2002. 3
- [14] Y. Koyama, K. Kubo, M. Komori, H. Yasuda, and Y. Mukai. Effect of Protonation on the Isomerization Properties of Normal-Butylamine Schiff-Base of Isomeric Retinal as Revealed by Direct HPLC Analyses - Selection of Isomerization Pathways by Retinal Proteins. *Photochem. Photobiol.*, 54(3):433–443, 1991. 4, 33, 51
- [15] K. A. Freedman and R. S. Becker. Comparative Investigation of the Photoisomerization of the Protonated and Unprotonated n-Butylamine Schiff Bases of 9-cis-, 11-cis-, 13-cis-, and all-trans-Retinals. *J. Am. Chem. Soc.*, 108:1245–1251, 1986. 4, 51
- [16] Y. Mukai, T. Imahori, and Y. Koyama. Comparison of the pathways and quantum yields of direct photoisomerization of unprotonated and protonated n-butylamine schiff-bases of isomeric retinylideneacetaldehyde with those of schiff-bases of isomeric retinal - rationalization of the selection of the retinylidene chromophore by retinochrome. *Photochem. Photobiol.*, 56:965–975, 1992. 4, 51
- [17] P. Hamm, M. Zurek, T. Roschinger, H. Patzelt, D. Oesterhelt, and W. Zinth. Femtosecond spectroscopy of the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-trans retinal. *Chem. Phys. Lett.*, 263:613–621, 1996. 4, 51
- [18] J. Tittor and D. Oesterhelt. The quantum yield of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 263:269–273, 1990. 4, 10, 11, 51
- [19] R. R. Birge. Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *BBA*, 1016:293–327, 1990. 4, 9, 51, 86, 87
- [20] G. Schneider, R. Diller, and M. Stockburger. Photochemical quantum yield of bacteriorhodopsin from resonance raman scattering as a probe for photolysis. *Chem. Phys.*, 131:17–29, 1989. 4, 11, 51
- [21] M. Rohr, W. Gärtner, G. Schweitzer, A. Holzwarth, and S. Braslavsky. Quantum Yields of the Photochromic Equilibrium between Bacteriorhodopsin and Its Bathointermediate K. Femto- and Nanosecond Optoacoustic Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 96:6055–6061, 1992. 4, 11, 51

- [22] S. Logunov, M. El-Sayed, L. Song, and J. Lanyi. Photoisomerization Quantum Yield and Apparent Energy Content of the K Intermediate in the Photocycles of Bacteriorhodopsin, Its Mutants D85N, R82Q, and D212N, and Deionized Blue Bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem.*, 100:2391–2398, 1996. 4, 11, 15, 30, 51, 63
- [23] S. L. Logunov and M. A. El-Sayed. Redetermination of the Quantum Yield of Photoisomerization and Energy Content in the K-Intermediate of Bacteriorhodopsin Photocycle and Its Mutants by the Photoacoustic Technique. *J. Phys. Chem. B*, 101:6629–6633, 1997. 4, 11, 51
- [24] H.-J. Polland, M.A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, and D. Oesterhelt. Early Picosecond Events in the Photocycle of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 49:651–662, 1986. 4, 11, 51, 79
- [25] M. A. El-Sayed and S. Logunov. On the molecular origin of the protein catalysis of the primary process in bacteriorhodopsin photosynthesis: Retinal photoisomerization. *Pure Appl. Chem.*, 69:749–754, 1997. 4, 30, 51
- [26] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten. Molecular Dynamics Simulation of Bacteriorhodopsin's Photoisomerization Using Ab Initio Forces for the Excited Chromophore. *Biophys. J.*, 85:1440–1449, 2003. 4, 51
- [27] C. R. Woese and G. E. Fox. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *PNAS*, 74:5088–5090, 1977. 7
- [28] Mit freundlicher Genehmigung des Image Science and NASA-Johnson Space Center. 18 Mar. 2005.
"Earth from Space Image Information." Analysis Laboratory, 2006. <http://earth.jsc.nasa.gov/sseop/efs/photoinfo.pl?PHOTO=STS035-501-9> (9 Nov. 2006). 7
- [29] D. Oesterhelt. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:489–500, 1998. 7, 12
- [30] G. Schäfer, M. Engelhard, and V. Müller. Bioenergetics of the archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63 suppl.:570–620, 1999. 7, 22
- [31] J. L. Spudich. Structural Biology: A Chloride Pump at Atomic Resolution. *Science*, 288(5470):1358–1359, 2000. 7
- [32] W. Marwan and D. Oesterhelt. Biochemische Mechanismen einer einfachen Verhaltensreaktion. *Chemie unserer Zeit*, 3:140–151, 1999. 7
- [33] R. Hartmann, H. D. Sickinger, and D. Oesterhelt. Anaerobic growth of halobacteria. *PNAS*, 77:3821–3825, 1980. 7

- [34] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius. Functions of a New Photoreceptor Membrane. *PNAS*, 70:2853–2857, 1973. 8, 9
- [35] I. Lutz. *Vielkanal-Femtosekunden-Spektroskopie der Primärreaktionen von archaebakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001. 8, 40, 42, 49
- [36] R. H. Lozier, R. A. Bogomolni, and W. Stoeckenius. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in Halobacterium Halobium. *Biophys. J.*, 15:955–962, 1975. 8, 11
- [37] H. W. Trissl and M. Montal. Electrical demonstration of rapid light-induced conformational-changes in bacteriorhodopsin. *Nature*, 266:655–657, 1977. 8
- [38] H. Michel and D. Oesterhelt. Light-induced changes of the pH gradient and the membrane potential in H. halobium. *FEBS Lett.*, 65:175–178, 1976. 9
- [39] W. Stoeckenius and R. A. Bogomolni. Bacteriorhodopsin and Related Pigments of Halobacteria. *Ann. Rev. Biochem.*, 52:587–616, 1982. 9, 21
- [40] E. Racker and W. Stoeckenius. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.*, 249:662–663, 1974. 9
- [41] B. Schobert and J. K. Lanyi. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.*, 257:10306–10313, 1982. 9, 21, 24
- [42] A. Duschl and G. Wagner. Primary and Secondary Chloride Transport in Halobacterium halobium. *J. Bacteriology*, 168:548–552, 1986. 9, 21
- [43] E. Hildebrand and N. Dencher. Two photosystems controlling behavioural responses of *Halobacterium halobium*. *Nature*, 257:46–48, 1975. 9
- [44] N. Hazemoto, N. Kamo, Y. Terayama, Y. Kobatake, and M. Tsuda. Photochemistry of two-rhodopsinlike pigments in bacteriorhodopsin-free mutant of *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.*, 44:59–64, 1983. 9
- [45] R. A. Bogomolni and J. L. Spudich. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic Halobacterium halobium. *PNAS*, 79:6250–6254, 1982. 9
- [46] J. L. Spudich and R. A. Bogomolni. Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, 312:509–513, 1984. 9

-
- [47] E. K. Wolff, R. A. Bogomolni, P. Scherrer, B. Hess, and W. Stoeckenius. Color discrimination in halobacteria: spectroscopic characterization of a second sensory receptor covering the blue-green region of the spectrum. *J. Phys. Chem. A*, 103:10083–10092, 1999. 9
- [48] W. D. Hoff, K.-H. Jung, and J. L. Spudich. Molecular mechanism of photo-signaling by archaeal sensory rhodopsins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26:223–258, 1997. 9
- [49] J. L. Spudich. Variations on a molecular switch: transport and sensory signaling by archaeal rhodopsins. *Mol. Microbiol.*, 28:1051–1058, 1998. 9
- [50] J. Sasaki and J. L. Spudich. Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer-binding. *BBA*, 1460:230–239, 2000. 9
- [51] S. Iliopoulos. Temperatur-Exkursions-Spektroskopie im Infraroten an Retinalproteinen. Master’s thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1999. 10
- [52] M. Kono, S. Misra, and T. G. Ebrey. pH dependence of light-induced proton release by bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 331:31–34, 1993. 10
- [53] S. P. Balashov, R. Govindjee, M. Kono, E. Imasheva, E. Lukashev, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, D. R. Menick, and Y. Feng. Effect of the arginine-82 to alanine mutation in bacteriorhodopsin on dark-adaptation, proton release, and the photochemical cycle. *Biochemistry*, 32(39):10331–10343, 1993. 10, 13
- [54] J. Riesle, D. Oesterhelt, N. A. Dencher, and J. Heberle. D38 Is an Essential Part of the Proton Translocation Pathway in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 35:6635–6643, 1996. 10
- [55] N. Friedman, I. Rouso, M. Sheves, X. Fu, S. Bressler, S. Druckmann, and M. Ottolenghi. Time-resolved titrations of Asp-85 in bacteriorhodopsin: The multicomponent kinetic mechanism. *Biochemistry*, 36:11369–11380, 1997. 10
- [56] R. Govindjee, S. Misra, S. P. Balashov, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, and D. R. Menick. Arginine-82 regulates the pK(a) of the group responsible for the light-driven proton release in bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 71:1011–1023, 1996. 10
- [57] S. Misra, R. Govindjee, T. G. Ebrey, N. Chen, J. X. Ma, and R. K. Crouch. Proton uptake and release are rate-limiting steps in the photocycle of the bacteriorhodopsin mutant e204q. *Biochemistry*, 36:4875–4883, 1997. 10
- [58] W. Oesterhelt and W. Stoeckenius. Rhodopsin-like protein from purple membrane of halobacterium-halobium. *Nature-new Biol.*, 233:149–154, 1971. 9

- [59] R. A. Mathies, S. W. Lin, J. B. Ames, and W. T. Pollard. From femtoseconds to biology - mechanism of bacteriorhodopsins light-driven proton pump. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 20:491–518, 1991. 9
- [60] U. Haupts, J. Tittor, and D. Oesterhelt. CLOSING IN ON BACTERIORHODOPSIN: Progress in Understanding the Molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28:367–399, 1999. 9
- [61] J. K. Lanyi, A. Duschl, G. W. Hatfield, K. May, and D. Oesterhelt. Understanding Structure and Function in the Light-Driven Proton Pump Bacteriorhodopsin. *J. Struct. Biol.*, 124:164–178, 1998. 9
- [62] J. K. Lanyi. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.*, 66:665–688, 2004. 9
- [63] C. A. Hasselbacher, J. L. Spudich, and T. G. Dewey. Circular dichroism of halorhodopsin: comparison with bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin i. *Biochemistry*, 27:15124–15129, 1988. 9
- [64] Y. A. Ovchinnikov, N. G. Abdulaev, M. Y. Feigina, A. V. Kiselev, and N. A. Lobanov. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview. *FEBS Lett.*, 100:219–224, 1979. 9, 21, 29, 63
- [65] H. G. Khorana, G. E. Gerber, W. C. Herlihy, Ch. P. Gray, R. J. Anderegg, K. Nihei, and K. Biemann. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *PNAS*, 76:5046–5050, 1979. 9, 21, 29, 63
- [66] R. Henderson and P. N. T. Unwin. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, 257:28–32, 1975. 9
- [67] E. Pebay-Peyroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch, and E. M. Landau. X-ray Structure of Bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from Microcrystals Grown in Lipidic Cubic Phases. *Science*, 277:1676–1681, 1997. 9
- [68] L. O. Essen, R. Siegert, W. D. Lehmann, and D. Oesterhelt. Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *PNAS*, 95:11673–11678, 1998. 9
- [69] H. Luecke, B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailler, and J. K. Lanyi. Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 291:899–911, 1999. 9, 29, 67
- [70] T. Schreckenbach, B. Walckhoff, and D. Oesterhelt. Studies on Retinal-Protein Interaction in Bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.*, 76(2):499–511, 1977. 9

-
- [71] V. Copié, A. E. McDermott, K. Beshah, J. C. Williams, M. Spijkerassink, R. Gebhard, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, and R. G. Griffin. Deuterium solid-state nuclear-magnetic-resonance studies of methyl-group dynamics in bacteriorhodopsin and retinal model compounds - evidence for a 6-s-trans chromophore in the protein. *Biochemistry*, 33:3280–3286, 1994. 9
- [72] A. E. McDermott, F. Creuzet, R. Gebhard, K. van der Hoef, M. H. Levitt, J. Herzfeld, J. Lugtenburg, and R. G. Griffin. Determination of internuclear distances and the orientation of functional groups by solid-state NMR: Rotational resonance study of the conformation of retinal in bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 33:6129–6136, 1994. 9
- [73] A. Lewis, J. Spoonhower, R. A. Bogomolni, R. H. Lozier, and W. Stoeckenius. Tunable Laser Resonance Raman-Spectroscopy of Bacteriorhodopsin. *PNAS*, 71(11):4462–4466, 1974. 9
- [74] N. V. Katre, P. K. Wolber, W. Stoeckenius, and R. M. Stroud. Attachment Site(S) of Retinal in Bacteriorhodopsin. *PNAS*, 78(7):4068–4072, 1981. 9
- [75] H.-D. Lemke and D. Oesterhelt. Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 128:255–260, 1981. 9
- [76] H. Bayley, K. S. Huang, R. Radhakrishnan, A. H. Ross, Y. Takagaki, and H. G. Khorana. Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin. *PNAS*, 78:2225–2229, 1981. 9
- [77] H. J. M. DeGroot, S. O. Smith, J. Courtin, E. Vandenberg, C. Winkel, J. Lugtenburg, R. G. Griffin, and J. Herzfeld. Solid-state ^{13}C and ^{15}N NMR-study of the low pH forms of bacteriorhodopsin. *Biochem.*, 29:6873–6883, 1990. 9, 30
- [78] M. Kataoka, H. Kamikubo, F. Tokunaga, L. S. Brown, Y. Yamazaki, A. Maeda, M. Sheves, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Energy coupling in an ion-pump - the reprotonation switch of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.*, 243:621–638, 1994. 9, 13, 14
- [79] H. Luecke, H. T. Richter, and J. K. Lanyi. Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 Angstrom resolution. *Science*, 280:1934–1937, 1998. 9
- [80] R. A. Haberkorn, J. Herzfeld, and R. G. Griffin. High-Resolution P-31 and C-13 Nuclear Magnetic-Resonance Spectra of Unsonicated Model Membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, 100(4):1296–1298, 1978. 10
- [81] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, and K. H. Downing. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.*, 213:899–929, 1990. 10, 21

- [82] G. S. Harbison, S. O. Smith, J. A. Pardoen, C. Winkel, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. Mathies, and R. G. Griffin. Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis,15-syn and all-trans,15-anti retinal schiff bases. *PNAS*, 81:1706–1709, 1984. 10
- [83] P. Scherrer, M. K. Mathew, W. Sperling, and W. Stoeckenius. Retinal Isomer Ratio in Dark-Adapted Purple Membrane and Bacteriorhodopsin Monomers. *Biochemistry*, 28:829–834, 1989. 10
- [84] J. Tittor, S. Paula, S. Subramaniam, J. Heberle, R. Henderson, and D. Osterhelt. Proton Translocation by Bacteriorhodopsin in the Absence of Substantial Conformational Changes. *J. Mol. Biol.*, 319:555–565, 2002. 10, 14
- [85] J. W. Petrich, J. Breton, J. L. Martin, and A. Antonetti. Femtosecond absorption spectroscopy of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 137:369–375, 1987. 10, 11
- [86] T. Mogi, L. J. Stern, T. Marti, B. H. Chao, and H. G. Khorana. Aspartic acid substitutions affect proton translocation by bacteriorhodopsin. *PNAS*, 85:4148–4152, 1988. 12
- [87] T. Marinetti, S. Subramaniam, T. Mogi, T. Marti, and H. G. Khorana. Replacement of aspartic residues 85, 96, 115, or 212 affects the quantum yield and kinetics of proton release and uptake by bacteriorhodopsin. *PNAS*, 86:529–533, 1989. 12
- [88] M. Kataoka and H. Kamikubo. Structures of photointermediates and their implications for the proton pump mechanism. *BBA*, 1460:166–176, 2000. 11
- [89] H. Luecke. Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *BBA*, 1460:133–156, 2000. 11
- [90] J. K. Lanyi. X-ray Crystallography of Bacteriorhodopsin and Its Photointermediates: Insights into the Mechanism of Proton Transport. *Biochemistry (Moscow)*, 66:1192–1196, 2001. 11
- [91] J. K. Lanyi. X-ray diffraction of bacteriorhodopsin photocycle intermediates (Review). *Mol. Membr. Biol.*, 21:143–150, 2004. 11
- [92] R. Govindjee, S. P. Balashov, and T. G. Ebrey. Quantum Efficiency of the Photochemical Cycle of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 58(3):597–608, 1990. 11
- [93] M. Renard and M. Delmelle. The Photochemical Quantum Yield of Bacteriorhodopsin is pH independent. *FEBS Lett.*, 128:245–248, 1981. 11

-
- [94] S. L. Logunov, L. Song, and M. A. El-Sayed. pH Dependence of the Rate and Quantum Yield of the Retinal Photoisomerization in Bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem.*, 98:10674–10677, 1994. 11
- [95] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius. Reversible Dissociation of the Purple Complex in Bacteriorhodopsin and Identification of 13-cis and all-trans-Retinal as its Chromophores. *Eur. J. Biochem.*, 40, 1973. 11, 30
- [96] M. J. Pettei, A. P. Yudd, K. Nakanishi, R. Henselman, and W. Stoeckenius. Femtosecond absorption spectroscopy of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 16:1955–1959, 1977. 11
- [97] B. Aton, R. H. Callender, B. Becher, and T. G. Ebrey. Resonance raman studies of purple membrane. *Biochemistry*, 16(13):2995–2999, 1977. 11, 12
- [98] M. Tsuda, M. Glaccum, B. Nelson, and T. G. Ebrey. Light isomerizes the chromophore of bacteriorhodopsin. *Nature*, 287:351–353, 1980. 11
- [99] M. Braiman and R. Mathies. Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: Evidence for a distorted 13-cis retinal chromophore. *PNAS*, 79:403–407, 1982. 11, 15, 16
- [100] R. van den Berg, D.-J. Jang, H. C. Bitting, and M. A. El-Sayed. Subpicosecond resonance Raman spectra of the early intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 58:135–141, 1990. 11
- [101] M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, and D. Oesterhelt. Femtosecond Spectroscopy of the First Events of the Photochemical Cycle in Bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 117:1–7, 1985. 11, 79
- [102] A. Sharkov, A. Pakulev, and Y. Matveetz. Primary Events in Bacteriorhodopsin Probed by Subpicosecond Spectroscopy. *BBA*, 808:94–102, 1985. 11
- [103] J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt. Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 144:215–220, 1988. 11, 15, 16, 17, 79, 84, 86, 87
- [104] J. Herbst, K. Heyne, and R. Diller. Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization. *Science*, 297:822–825, 2002. 11, 16
- [105] S. J. Doig, P. J. Reid, and R. A. Mathies. Picosecond Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin's J, K, and KL Intermediates. *J. Phys. Chem.*, 95:6372–6379, 1991. 11, 15, 16

- [106] J. Tittor, C. Soell, D. Oesterhelt, H. J. Butt, and E. Bamberg. A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96 to Asn is fully reactivated by azide. *EMBO J.*, 8:3477–3482, 1989. 12, 13
- [107] L. J. Stern, P. L. Ahl, T. Marti, T. Mogi, M. Dunach, S. Berkowitz, K. J. Rothschild, and H. G. Khorana. Substitution of membrane-embedded aspartic acids in bacteriorhodopsin causes specific changes in different steps of the photochemical cycle. *Biochemistry*, 28:10035–10042, 1989. 12
- [108] L. S. Brown, Y. Gat, M. Sheves, Y. Yamazaki, A. Maeda, R. Needleman, and J. K. Lanyi. The retinal schiff base-counterion complex of bacteriorhodopsin - changed geometry during the photocycle is a cause of proton-transfer to aspartate-85. *Biochemistry*, 33:12001–12011, 1994. 12
- [109] A. Maeda, J. Sasaki, Y. Yamazaki, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Interaction of aspartate-85 with a water molecule and the protonated schiff-base in the l-intermediate of bacteriorhodopsin - a fourier-transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry*, 33:1713–1717, 1994. 12
- [110] K. Edman, P. Nollert, A. Royant, H. Belrhali, E. Pebay-Peyroula, J. Hajdu, R. Neutze, and E. M. Landau. High-resolution X-ray structure of an early intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle. *Nature*, 401:822–826, 1999. 12
- [111] J. K. Lanyi and B. Schobert. Mechanism of proton transport in bacteriorhodopsin from crystallographic structures of the K, L, M-1, M-2, and M-2' intermediates of the photocycle. *J. Mol. Biol.*, 328:439–450, 2003. 12
- [112] T. Kouyama, T. Nishikawa, T. Tokuhisa, and H. Okumura. Crystal Structure of the L Intermediate of Bacteriorhodopsin: Evidence for Vertical Translocation of a Water Molecule during the Proton Pumping Cycle. *J. Mol. Biol.*, 335:531–546, 2004. 12
- [113] S. Druckmann, M. Ottolenghi, A. Pande, J. Pande, and R. H. Callender. Acid-base equilibrium of the schiff base in bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 21:4953–4959, 1982. 12
- [114] M. S. Braiman, T. Mogi, L. J. Stern, N. R. Hackett, B. H. Chao, H. G. Khorana, and K. J. Rothschild. Vibrational Spectroscopy of Bacteriorhodopsin Mutants: Tyrosine-185 Protonates and Deprotonates During the Photocycle. *Proteins-Struct. Funct. Gen.*, 3(4):219–229, 1988. 12, 13
- [115] H. J. Butt, K. Fendler, E. Bamberg, J. Tittor, and D. Oesterhelt. Aspartic Acid-96 and Aspartic Acid-85 Play a Central Role in the Function of Bacteriorhodopsin as a Proton Pump. *EMBO Journal*, 8(6):1657–1663, 1989. 12, 13

-
- [116] T. E. Thorgeirsson, S. J. Milder, L. J. W. Miercke, M. C. Betlach, R. F. Shand, R. M. Stroud, and D. S. Kliger. Effects of asp-96 - asn, asp-85 - asn, and arg-82 - gln single-site substitutions on the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 30(38):9133–9142, 1991. 12
- [117] K. Fahmy, O. Weidlich, M. Engelhard, J. Tittor, D. Oesterhelt, and F. Siebert. Identification of the Proton Acceptor of Schiff-Base Deprotonation in Bacteriorhodopsin - A Fourier-Transform-Infrared Study of the Mutant Asp85 → Glu in its Natural Lipid Environment. *Photochem. Photobiol.*, 56:1073–1083, 1992. 12
- [118] G. Metz, F. Siebert, and M. Engelhard. Asp⁸⁵ is the only internal aspartic acid that gets protonated in the M intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 303:237–241, 1992. 12, 30
- [119] L. S. Brown, G. Váró, M. Hatanaka, J. Sasaki, H. Kandori, A. Maeda, N. Friedman, M. Sheves, R. Needleman, and J. K. Lanyi. The complex extracellular domain regulates the deprotonation and reprotonation of the retinal schiff-base during the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry*, 34:12903–12911, 1995. 13
- [120] H. T. Richter, L. S. Brown, R. Needleman, and J. K. Lanyi. A linkage of the pK(a)'s of asp-85 and glu-204 forms part of the reprotonation switch of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 35(13):4054–4062, 1996. 13
- [121] S. P. Balashov, E. S. Imasheva, R. Govindjee, and T. G. Ebrey. Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release. *Biophys. J.*, 70:473–481, 1996. 13
- [122] R. Rammelsberg, G. Huhn, M. Lubben, and K. Gerwert. Bacteriorhodopsin's intramolecular proton-release pathway consists of a hydrogen-bonded network. *Biochemistry*, 37(14):5001–5009, 1998. 13, 25
- [123] L. S. Brown, Y. Yamazaki, A. Maeda, L. Sun, R. Needleman, and J. K. Lanyi. The Proton Transfers in the Cytoplasmic Domain of Bacteriorhodopsin Are Facilitated by a Cluster of Interacting Residues. *J. Mol. Biol.*, 239(3):401–414, 1994. 13
- [124] Y. Cao, L. S. Brown, J. Sasaki, A. Maeda, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Relationship of proton release at the extracellular surface to deprotonation of the schiff-base in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.*, 68:1518–1530, 1995. 13
- [125] S. P. Balashov, E. S. Imasheva, T. G. Ebrey, N. Chen, D. R. Menick, and R. K. Crouch. Glutamate-194 to cysteine mutation inhibits fast light-induced proton release in bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 36(29):8671–8676, 1997. 13

- [126] A. K. Dioumaev, H. T. Richter, L. S. Brown, M. Tanio, S. Tuzi, H. Saito, Y. Kimura, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Existence of a proton transfer chain in bacteriorhodopsin: Participation of Glu-194 in the release of protons to the extracellular surface. *Biochemistry*, 37(8):2496–2506, 1998. 13
- [127] J. Heberle, J. Riesle, G. Thiedemann, D. Oesterhelt, and N. A. Dencher. Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature*, 370:379–, 1994. 13
- [128] G. Váró and J. K. Lanyi. Kinetic and spectroscopic evidence for an irreversible step between deprotonation and reprotonation of the Schiff base in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry*, 30:5008–5015, 1991. 13
- [129] G. Váró and J. K. Lanyi. Thermodynamics and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry*, 30:5016–5022, 1991. 13
- [130] T. Oka, K. Inoue, M. Kataoka, and N. Yagi. Structural transition of bacteriorhodopsin is preceded by deprotonation of Schiff base: Microsecond time-resolved X-ray diffraction study of purple membrane. *Biophys. J.*, 88:436–442, 2005. 13
- [131] M. Holz, L. A. Drachev, T. Mogi, H. Otto, A. D. Kaulen, M. P. Heyn, V. P. Skulachev, and H. G. Khorana. Replacement of aspartic acid-96 by asparagine in bacteriorhodopsin slows both the decay of the M-intermediate and the associated proton movement. *PNAS*, 86:2167–2171, 1989. 13
- [132] A. Miller and D. Oesterhelt. Nonlinear Refractive Index Coefficient for Nd Phosphate Laser Glasses. *IEEE J. of Quantum Electronics*, 1020:57–64, 1990. 13
- [133] Y. Cao, G. Váró, M. Chang, B. F. Ni, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Water Is Required for Proton-Transfer from Aspartate-96 to the Bacteriorhodopsin Schiff-Base. *Biochemistry*, 30(45):10972–10979, 1991. 13
- [134] K. Gerwert, B. Hess, J. Soppa, and D. Oesterhelt. Role of aspartate-96 in proton translocation by bacteriorhodopsin. *PNAS*, 86(13):4943–4947, 1989. 13
- [135] H. Otto, T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana, and M. P. Heyn. Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the schiff-base of bacteriorhodopsin. *PNAS*, 86:9228–9232, 1989. 13
- [136] C. Zscherp and J. Heberle. Infrared Difference Spectra of the Intermediates L, M, N, and O of the Bacteriorhodopsin Photoreaction Obtained by Time-Resolved Attenuated Total Reflection Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.*, 1997. 13

-
- [137] L. Zimányi and J. K. Lanyi. Deriving the Intermediate Spectra and Photocycle Kinetics from Time-Resolved Difference Spectra of Bacteriorhodopsin - the Simpler Case of the Recombinant D96N Protein. *Biophys. J.*, 64(1):240–251, 1993. 13
- [138] S. O. Smith, J. A. Pardo, P. P. J. Mulder, B. Curry, J. Lugtenburg, and R. Mathies. Chromophore Structure in Bacteriorhodopsins-O640 Photointermediate. *Biochemistry*, 22(26):6141–6148, 1983. 13, 16
- [139] G. Souvignier and K. Gerwert. Proton uptake mechanism of bacteriorhodopsin as determined by time-resolved stroboscopic-FTIR -spectroscopy. *Biophys. J.*, 63:1393–1405, 1992. 13
- [140] J. K. Lanyi. The local-access mechanism of proton transport by bacteriorhodopsin. *BBA*, 1365:17–22, 1998. 13
- [141] L. S. Brown, A. K. Dioumaev, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Local-Access Model for Proton Transfer in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 37:3982–3993, 1998. 13
- [142] L. S. Brown, A. K. Dioumaev, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Connectivity of the Retinal Schiff Base to Asp⁸⁵ and Asp⁹⁶ during the Bacteriorhodopsin Photocycle: The Local-Access Model. *Biophys. J.*, 75:1455–1465, 1998. 13
- [143] W. Humphrey, E. Bamberg, and K. Schulten. Photoproducts of Bacteriorhodopsin Mutants: A Molecular Dynamics Study. *Biophys. J.*, 72:1347–1356, 1997. 13, 17
- [144] L. S. Brown, H. Kamikubo, L. Zimányi, M. Kataoka, F. Tokunaga, P. Verdgem, J. Lugtenburg, and J. K. Lanyi. A local electrostatic change is the cause of the large-scale protein conformation shift in bacteriorhodopsin. *PNAS*, 94:5040–5044, 1997. 13
- [145] U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, and D. Oesterhelt. General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model. *Biochemistry*, 36:2–7, 1997. 14, 62
- [146] J. Tittor, U. Haupts, C. Haupts, D. Oesterhelt, A. Becker, and E. Bamberg. Chloride and proton transport in bacteriorhodopsin mutant D85T: Different modes of ion translocation in a retinal protein. *J. Mol. Biol.*, 271:405–416, 1997. 14, 31, 34, 36, 51, 62, 66
- [147] N. A. Dencher, D. Dresselhaus, G. Zaccai, and G. Buldt. Structural-changes in bacteriorhodopsin during proton translocation revealed by neutron-diffraction. *PNAS*, 86(20):7876–7879, 1989. 14

- [148] M. H. J. Koch, N. A. Dencher, D. Oesterhelt, H. J. Plohn, G. Rapp, and G. Buldt. Time-resolved x-ray-diffraction study of structural-changes associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *EMBO J.*, 10:521–526, 1991. 14
- [149] M. Nakasako, M. Kataoka, Y. Amemiya, and F. Tokunaga. Crystallographic characterization by x-ray-diffraction of the m-intermediate from the photocycle of bacteriorhodopsin at room-temperature. *FEBS Lett.*, 292:73–75, 1991. 14
- [150] B. G. Han, J. Vonck, and R. M. Glaeser. The bacteriorhodopsin photocycle - direct structural study of 2 substates of the m-intermediate. *Biophys. J.*, 67:1179–1186, 1994. 14
- [151] T. Hauss, G. Buldt, M. P. Heyn, and N. A. Dencher. Light-induced isomerization causes an increase in the chromophore tilt in the m-intermediate of bacteriorhodopsin - a neutron-diffraction study. *PNAS*, 91(25):11854–11858, 1994. 14
- [152] H. J. Sass, G. Buldt, R. Gessenich, D. Hehn, D. Neff, R. Schlesinger, J. Berendzen, and P. Ormos. Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature*, 406:649–653, 2000. 14
- [153] S. P. A. Fodor, J. B. Ames, R. Gebhard, E. M. M. Vandenberg, W. Stoeckenius, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies. Chromophore structure in bacteriorhodopsins-N intermediate - implications for the proton-pumping mechanism. *Biochemistry*, 27:7097–7101, 1988. 14
- [154] R. Subramaniam, S. A. Koch, and G. S. Harbison. N-14 NMR and X-Ray Single-Crystal Study of the Schiff-Base N-(9-Anthrylmethylidene)Methylamine. *J. Phys. Chem.*, 97(33):8625–8629, 1993. 14
- [155] K. Schulten and P. Tavan. A mechanism for the light-driven proton pump of *Halobacterium halobium*. *Nature*, 272:85–86, 1978. 14
- [156] J. K. Lanyi and B. Schobert. Crystallographic Structure of the Retinal and the Protein after Deprotonation of the Schiff Base: The Switch in the Bacteriorhodopsin Photocycle. *J. Mol. Biol.*, 321:727–737, 2002. 14
- [157] G. Haran, K. Wynne, A. Xie, Q. He, M. Chance, and R. M. Hochstrasser. Excited state dynamics of bacteriorhodopsin revealed by transient stimulated emission spectra. *Chem. Phys. Lett.*, 261:389–395, 1996. 15, 18, 79
- [158] F. Gai, J. C. McDonald, and P. A. Anfinrud. Pump-Dump-Probe Spectroscopy of Bacteriorhodopsin: Evidence for a Near-IR Excited State Absorbance. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:6201–6202, 1997. 15, 79

- [159] F. Gai, K. C. Hasson, J. C. McDonald, and P. Anfinrud. Chemical Dynamics in Proteins: The Photoisomerization of Retinal in Bacteriorhodopsin. *Science*, 279:1886–1891, 1998. 15, 17, 86, 87
- [160] T. Ye, N. Friedman, Y. Gat, G. Atkinson, M. Sheves, M. Ottolenghi, and S. Ruhman. On the Nature of the Primary Light-Induced Events in Bacteriorhodopsin: Ultrafast Spectroscopy of Native and C₁₃=C₁₄ Locked Pigments. *J. Phys. Chem. B*, 103:5122–5130, 1999. 15, 16, 17, 71, 79, 88
- [161] K. C. Hasson, F. Gai, and P. A. Anfinrud. The photoisomerization of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three-state model. *PNAS*, 93, 1996. 15, 17, 18, 71, 79, 86, 87
- [162] J. T. M. Kennis, D. S. Larsen, K. Ohta, M. T. Facciotti, R. M. Glaeser, and G. R. Fleming. Ultrafast protein dynamics of bacteriorhodopsin probed by photon echo and transient absorption spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 106:6067–6080, 2002. 15
- [163] S. Haacke, S. Schenkl, S. Vinzani, and M. Chergui. Femtosecond and Picosecond Fluorescence of Native Bacteriorhodopsin and a Nonisomerizing Analog. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 67:306–309, 2002. 15, 71, 78
- [164] M. Du and G. Fleming. Femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy of bacteriorhodopsin: Direct observation of excited state dynamics in the primary step of the proton pump cycle. *Biophys. Chem.*, 48:101–111, 1993. 15, 17, 71, 78, 80
- [165] T. Ye, E. Gershgoren, N. Friedman, M. Ottolenghi, M. Sheves, and S. Ruhman. Revolving the primary dynamics of bacteriorhodopsin, and of 'C₁₃=C₁₄ locked' analog, in the reactive excited state. *Chem. Phys. Lett.*, 314:429–434, 1999. 15, 79
- [166] R. Akiyama, A. Yoshimori, T. Kakitani, Y. Imamoto, Y. Shichida, and Y. Hatano. Analysis of the excited-state dynamics of 13-*trans*-locked bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem. A*, 101:412–417, 1997. 15, 79
- [167] Q. Zhong, S. Ruhman, and M. Ottolenghi. Reexamining the Primary Light-Induced Events in Bacteriorhodopsin Using a Synthetic C₁₃=C₁₄-Locked Chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:12828–12829, 1996. 15, 79
- [168] S. Haacke, S. Vinzani, S. Schenkl, and M. Chergui. Spectral and Kinetic Fluorescence Properties of Native and Nonisomerizing Retinal in Bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Chem.*, 2:310–315, 2001. 15
- [169] S. Ruhman, B. Hou, N. Friedman, M. Ottolenghi, and M. Sheves. Following Evolution of Bacteriorhodopsin in Its Reactive Excited State via Stimulated Emission Pumping. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:8854–8858, 2002. 15

- [170] H.-J. Polland, M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling, and D. Oesterhelt. Optical Picosecond Study of Bacteriorhodopsin Containing a Sterically Fixed Retinal. *BBA*, 767:635–639, 1984. 15, 16
- [171] B. Schobert, J. Cupp-Vickery, V. Hornak, S. O. Smith, and J. K. Lanyi. Crystallographic structure of the K intermediate of bacteriorhodopsin: Conservation of free energy after photoisomerization of the retinal. *J. Mol. Biol.*, 321:715–726, 2002. 15
- [172] L. Ujj, Y. D. Zhou, M. Sheves, M. Ottolenghi, S. Ruhman, and G. H. Atkinson. Vibrational spectrum of a picosecond intermediate in the artificial br5.12 photoreaction: Picosecond time-resolved cars of t5.12. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:96–106, 2000. 15, 16
- [173] T. Alshuth, M. Stockburger, P. Hegemann, and D. Oesterhelt. Structure of the retinal chromophore in halorhodopsin - a resonance raman-study. *FEBS Lett.*, 179:55–59, 1985. 15, 22
- [174] F. Siebert and W. Mäntele. Investigation of the Primary Photochemistry of Bacteriorhodopsin by Low-Temperature Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 130:565–573, 1983. 16
- [175] K. Fahmy, F. Siebert, M. F. Großjean, and P. Tavan. Photoisomerization in bacteriorhodopsin studied by FTIR, linear dichroism and photoselection experiments combined with quantum chemical theoretical analysis. *J. Molecul. Struct.*, 214:257–288, 1989. 16
- [176] K. Fahmy, F. Siebert, and P. Tavan. Structural investigation of bacteriorhodopsin and some of its photoproducts by polarized fourier-transform infrared spectroscopic methods-difference spectroscopy and photoselection. *Biophys. J.*, 60:989–1001, 1991. 16
- [177] T. L. Brack and G. H. Atkinson. Vibrationally excited retinal in the bacteriorhodopsin photocycle: picosecond time-resolved anti-Stokes resonance Raman scattering. *J. Phys. Chem.*, 95:2351–2356, 1991. 16
- [178] J. Herbst. *Charakterisierung der Photoisomerisierung in Bakteriorhodopsin durch Femtosekunden-Infrarot-Schwingungsspektroskopie*. PhD thesis, Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin, 2002. 16
- [179] D. Xu, C. Martin, and K. Schulten. Molecular dynamics study of early picosecond events in the bacteriorhodopsin photocycle: dielectric response, vibrational cooling and the J, K intermediates. *Biophys. J.*, 70:453–460, 1996. 16

-
- [180] G. H. Atkinson, L. Ujj, and Y. Zhou. Vibrational Spectrum of the J-625 Intermediate in the Room Temperature Bacteriorhodopsin Photocycle. *J. Phys. Chem. A*, 104:4130–4139, 2000. 16
- [181] R. Mathies, C. Cruz, W. Pollard, and C. Shank. Direct Observation of the Femtosecond Excited-State Cis-Trans Isomerisation in Bacteriorhodopsin. *Science*, 240:777–779, 1988. 16, 17, 71, 79, 84, 86, 87
- [182] G. H. Atkinson, T. L. Brack, D. Blanchard, and G. Rumbles. Picosecond Time-Resolved Resonance Raman-Spectroscopy of the Initial Trans to Cis Isomerization in the Bacteriorhodopsin Photocycle. *Chem. Phys.*, 131(1):1–15, 1989. 16
- [183] K. Schulten, W. Humphrey, I. Logunov, M. Sheves, and D. Xu. Molecular dynamics studies of bacteriorhodopsin,s photocycles. *Isr. J. Chem.*, 35:447–464, 1995. 17
- [184] R. R. Alfano, W. Yu, R. Govindjee, B. Becher, and T. G. Ebrey. Picosecond Kinetics Of The Fluorescence From The Chromophore Of The Purple Membrane Protein Of Halobacterium Halobium. *Biophys. J.*, 16:541–545, 1976. 18
- [185] S. L. Shapiro, A. J. Campillo, A. Lewis, G. J. Perreault, J. P. Spoonhower, R. K. Clayton, and W. Stoeckenius. Picosecond and Steady-State, Variable Intensity and Variable Temperature Emission-Spectroscopy of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 23:383–393, 1978. 18
- [186] A. N. Kriebel, T. Gillbro, and U. P. Wild. Low-temperature investigation of the intermediates of the photocycle of light-adapted bacteriorhodopsin - optical-absorption and fluorescence measurements. *BBA*, 546(1):106–120, 1979. 18
- [187] A. Franz. *Pikosekunden-Spektroskopie an retinalhaltigen Photosystemen*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Technischen Universität München, 1986. 18
- [188] S. L. Logunov, T. M. Masciangioli, V. F. Kamalov, and M. A. El-Sayed. Low-temperature retinal photoisomerization dynamics in bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem. B*, 102(13):2303–2306, 1998. 18
- [189] S. L. Dexheimer, Q. Wang, L. A. Peteanu, W. T. Pollard, R. A. Mathies, and C. V. Shank. Femtosecond impulsive excitation of nonstationary vibrational states in bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 188:61–66, 1992. 18
- [190] H. Abramczyk. Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin and its retinal modified analogs: Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Chem. Phys.*, 120:11120–11132, 2004. 19, 86, 87, 88

- [191] R. Gonzalez-Luque, M. Garavelli, F. Bernardi, M. Merchan, M. A. Robb, and M. Olivucci. Computational evidence in favor of a two-state, two-mode model of the retinal chromophore photoisomerization. *PNAS*, 97:9379–9384, 2000. 20, 86, 87, 88
- [192] E. Teller. The crossing of potential surfaces. *J. Phys. Chem.*, 41:109–116, 1937. 20
- [193] M. Klessinger. Conical Intersections and the Mechanism of Singlet Photoreactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34:549–551, 1995. 20
- [194] M. Garavelli, T. Vreven, P. Celani, F. Bernardi, M. A. Robb, and M. Olivucci. Photoisomerization Path for a Realistic Retinal Chromophore Model: The Nonatetraeniminium Cation. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:1285–1288, 1998. 20, 21
- [195] M. Garavelli, F. Negri, and M. Olivucci. Initial Excited-State Relaxation of the Isolated 11-cis Protonated Schiff Base of Retinal: Evidence for in-Plane Motion from ab Initio Quantum Chemical Simulation of the Resonance Raman Spectrum. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:1023–1029, 1999. 20, 86, 87, 88
- [196] L. De Vico, C. S. Page, M. Garavelli, F. Bernardi, R. Basosi, and M. Olivucci. Reaction Path Analysis of the "Tunable" Photoisomerization Selectivity of Free and Locked Retinal Chromophores. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:4124–4134, 2002. 20
- [197] L. Song and M. A. El-Sayed. Primary step in bacteriorhodopsin photosynthesis: Bond stretch rather than angle twist of its retinal excited-state structure. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:8889–8890, 1998. 20
- [198] R. Henderson. Purple Membrane from Halobacterium-Halobium. *Annu. Rev. Biophys. Bioengineer.*, 6:87–109, 1977. 21
- [199] W. Stoeckenius, R. H. Lozier, and R. A. Bogomolni. Bacteriorhodopsin and the Purple Membrane of Halobacteria. *BBA*, 505(3-4):215–278, 1979. 21
- [200] J. K. Lanyi. Halorhodopsin: A Light-Driven Chloride Ion Pump. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 15:11–28, 1986. 21
- [201] G. Váró. Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin. *BBA*, 1460:220–229, 2000. 21
- [202] D. Oesterhelt. Structure and function of halorhodopsin. *Isr. J. Chem.*, 35:475–494, 1995. 21, 25, 29, 61
- [203] D. Oesterhelt, P. Hegemann, and M. Steiner. The photocycle of the chloride pump halorhodopsin. ii. Quantum yields and a kinetic model. *EMBO J.*, 4:2351–2356, 1985. 21, 24, 25

-
- [204] E. Bamberg, J. Tittor, and D. Oesterhelt. Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin. *PNAS*, 90:639–643, 1993. 21, 30
- [205] M. Steiner and D. Oesterhelt. Isolation and properties of the native chromo-protein halorhodopsin. *EMBO J.*, 2:1379–1385, 1983. 21, 36
- [206] R. A. Bogomolni, M. E. Taylor, and W. Stoeckenius. Reconstitution of purified halorhodopsin. *PNAS*, 81:5408–5411, 1984. 21
- [207] L. Zimányi and J. K. Lanyi. Transient Spectroscopy of Bacterial Rhodopsins with an Optical Multichannel Analyzer: Effects of Anions on the Halorhodopsin Photocycle. *Biochemistry*, 28:5172–5178, 1989. 21
- [208] N. Hazemoto, N. Kamo, Y. Kobatake, M. Tsuda, and Y. Terayama. Effect of salt on photocycle and ion-pumping of halorhodopsin and 3rd rhodopsinlike pigment of Halobacterium-halobium. *Biophys. J.*, 45:1073–1077, 1984. 21
- [209] P. Hegemann, D. Oesterhelt, and E. Bamberg. The transport activity of the light-driven chloride pump halorhodopsin is regulated by green and blue-light. *BBA*, 819:195–205, 1985. 21
- [210] W. Gmelin, K. Zeth, R. Efremov, J. Heberle, J. Tittor, and D. Oesterhelt. The Crystal Structure of the L1 Intermediate of Halorhodopsin at 1.9 Å Resolution. *Photochem. Photobiol.*, submitted, 2006. 22
- [211] A. Blanck and D. Oesterhelt. The halo-opsin gene: Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. *EMBO J.*, 6:265–273, 1987. 21, 29, 63
- [212] W. A. Havelka, R. Henderson, J. A. W. Heymann, and D. Oesterhelt. Projection structure of halorhodopsin from *Halobacterium halobium* at 6 Å resolution obtained by electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, 234:837–846, 1993. 21
- [213] W. A. Havelka, R. Henderson, and D. Oesterhelt. 3-Dimensional Structure of Halorhodopsin at 7 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 247(4):726–738, 1995. 21
- [214] E. R. S. Kunji, S. von Gronau, D. Oesterhelt, and R. Henderson. The three-dimensional structure of halorhodopsin to 5 angstrom by electron crystallography: A new unbending procedure for two-dimensional crystals by using a global reference structure. *PNAS*, 97(9):4637–4642, 2000. 21
- [215] M. Kolbe, H. Besir, L.-O. Essen, and D. Oesterhelt. Structure of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin at 1.8 Å Resolution. *Science*, 288:1390–1396, 2000. 21, 29, 36

- [216] M. Kolbe. *Röntgenographische und spektroskopische Charakterisierung der lichtgetriebenen Ionenpumpe Halorhodopsin aus Halobacterium salinarum*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001. 21, 23
- [217] M. Neumüller and F. Jähnig. Modeling of Halorhodopsin and Rhodopsin based on Bacteriorhodopsin. *Proteins*, 26:146–156, 1996. 21
- [218] D. Oesterhelt, J. Tittor, and E. Bamberg. A Unifying Concept for Ion Translocation by Retinal Proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 24:181–191, 1992. 21
- [219] R. Diller, M. Stockburger, D. Oesterhelt, and J. Tittor. Resonance Raman study of intermediates of the halorhodopsin photocycle. *FEBS Lett.*, 217:297–304, 1987. 22, 25
- [220] A. Maeda, T. Ogurusu, T. Yoshizawa, and T. Kitagawa. Resonance raman-study on binding of chloride to the chromophore of halorhodopsin. *Biochemistry*, 24:2517–2521, 1985. 22
- [221] C. Pande, J. K. Lanyi, and R. H. Callender. Effects of various anions on the Raman spectrum of halorhodopsin. *Biophys. J.*, 55:425–431, 1989. 22
- [222] J. B. Ames, J. Raap, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies. Resonance Raman Study of Halorhodopsin Photocycle Kinetics, Chromophore Structure, and Chloride-Pumping Mechanism. *Biochemistry*, 31:12546–12554, 1992. 22, 25
- [223] B. Schobert, J. K. Lanyi, and D. Oesterhelt. Effects of Anion Binding on the Deprotonation Reactions of Halorhodopsin. *J. Biol. Chem.*, 261:2690–2696, 1986. 22, 25
- [224] J. K. Lanyi, A. Duschl, G. W. Hatfield, K. May, and D. Oesterhelt. The Primary Structure of a Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. *J. Biol. Chem.*, 265:1253–1260, 1990. 22
- [225] M. Rüdiger, U. Haupts, K. Gerwert, and D. Oesterhelt. Chemical reconstitution of a chloride pump inactivated by a single-point mutation. *Embo J.*, 14:1599–1606, 1995. 23
- [226] M. S. Braiman, T. J. Walter, and D. M. Briercheck. Infrared spectroscopic detection of light-induced change in chloride-arginine interaction in halorhodopsin. *Biochemistry*, 33:1629–1635, 1994. 23, 25
- [227] N. Kamo, N. Hazemoto, Y. Kobatake, and Y. Mukohata. Light And Dark-Adaptation Of Halorhodopsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 238:90–96, 1985. 23, 36

- [228] G. Váró, L. S. Brown, J. Sasaki, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Light-Driven Chloride Ion Transport by Halorhodopsin from *natronobacterium pharaonis*. 1. The Photochemical Cycle. *Biochemistry*, 34:14490–14499, 1995. 23, 36
- [229] L. Zimányi and J. K. Lanyi. Fourier Transform Raman Study of Retinal Isomeric Composition and Equilibration in Halorhodopsin. *J. Phys. Chem. B*, 101:1930–1933, 1997. 23, 36
- [230] T. Ogurusu, A. Maeda, N. Sasaki, and T. Yoshizawa. Light-Induced Reaction of Halorhodopsin Prepared under Low Salt Conditions. *J. Biochem.*, 90:1267–1274, 1981. 24
- [231] J. Tittor, D. Oesterhelt, R. Maurer, H. Desel, and R. Uhl. The photochemical cycle of halorhodopsin: absolute spectra of intermediates obtained by flash photolysis and fast difference spectra measurements. *Biophys. J.*, 52:999–1006, 1987. 24, 25
- [232] B. Schobert, J. K. Lanyi, and E. J. Cragoe Jr. Evidence for a halide-binding site in halorhodopsin. *J. Biol. Chem.*, 258:15158–15164, 1983. 24
- [233] H. Kandori, K. Yoshihara, H. Tomioka, and H. Sasabe. Primary Photochemical Events in Halorhodopsin Studied by Subpicosecond Time-Resolved Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 96:6066–6071, 1992. 25, 27
- [234] J. K. Lanyi. Light-dependent *trans* to *cis* isomerization of the retinal in halorhodopsin. *FEBS Lett.*, 175:337–342, 1984. 25
- [235] D. Oesterhelt, P. Hegemann, P. Tavan, and K. Schulten. Trans-cis isomerization of retinal and a mechanism for ion translocation in halorhodopsin. *Eur. Biophys. J.*, 14:123–129, 1986. 25
- [236] N. Hazemoto, N. Kamo, and Y. Kobatake. Suggestion of existence of two forms of halorhodospin in alkaline solution. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 118:502–507, 1984. 25
- [237] S. P. A. Fodor, R. A. Bogomolni, and R. A. Richard. Structure of the Retinal Chromophore in the hR L Intermediate of Halorhodopsin from Resonance Raman Spectroscopy. *Biochemistry*, 26:6775–6778, 1987. 25
- [238] F. Peters, J. Herbst, J. Tittor, D. Oesterhelt, and R. Diller. Primary reaction dynamics of halorhodopsin, observed by sub-picosecond IR-vibrational spectroscopy. *Chem. Phys.*, 323:109–116, 2006. 25, 29, 62, 69
- [239] K. J. Rothschild. Infrared Studies OF Bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.*, 47:883–887, 1988. 25

- [240] H.-J. Polland, M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, P. Hegemann, and D. Oesterhelt. Picosecond Events in the Photochemical Cycle of the Light-Driven Chloride-Pump Halorhodopsin. *Biophys. J.*, 47:55–59, 1985. 25, 26, 62
- [241] H.-J. Polland. *Die ersten Schritte der Photosynthese in den retinalhaltigen Proteinen Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Technischen Universität München, 1984. 25
- [242] M. Steiner, D. Oesterhelt, M. Ariki, and J. K. Lanyi. Halide binding by the purified halorhodopsin chromoprotein- effects on the chromophore. *J. Biol. Chem.*, 259:2179–2184, 1984. 25
- [243] T. J. Walter and M. S. Braiman. Anion-protein interactions during halorhodopsin pumping: Halide binding at the protonated schiff base. *Biochemistry*, 33:1724–1733, 1994. 25
- [244] H. Kandori, K. Yoshihara, H. Tomioka, and H. Sasabe. Subpicosecond transient absorption spectrum of the excited state of a retinal protein, halorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 187:579–582, 1991. 27
- [245] H. Kandori, K. Yoshihara, H. Tomioka, H. Sasabe, and Y. Shichida. Comparative-Study of Primary Photochemical Events of 2 Retinal Proteins, Bakteriorhodopsin and Halorhodopsin, by Use of Subpicosecond Time-Resolved Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 211:385–391, 1993. 27
- [246] T. Kobayashi, M. Kim, M. Taiji, T. Iwasa, M. Nakagawa, and M. Tsuda. Femtosecond Spectroscopy of Halorhodopsin and Rhodopsin in a Broad Spectral Range of 400-1000 nm. *J. Phys. Chem. B*, 102:272–280, 1998. 28
- [247] T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts, and D. Oesterhelt. The initial reaction dynamics of the light-driven chloride pump halorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 241:559–565, 1995. 28, 29, 62
- [248] T. Arlt. *Femtosekundenspektroskopie schneller Transportprozesse in biologischen Systemen*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Technischen Universität München, 1996. 28
- [249] F. Peters. *Femtosekunden zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie zur vergleichenden Untersuchung von trans-cis-Isomerisierungs-Reaktionen in Halorhodopsin und Bakteriorhodopsin*. PhD thesis, Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin, 2005. 29
- [250] K. Ihara, T. Umemura, I. Katagiri, T. Kitajima-Ihara, Y. Sugiyama, Y. Kimura, and Y. Mukohata. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J. Mol. Biol.*, 285:163–174, 1999. 29

-
- [251] G. Váró, L. S. Brown, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Proton Transport by Halorhodopsin. *Biochemistry*, 35:6604–6611, 1996. 30
- [252] A. Dér, S. Száraz, R. Tóth-Boconádi, Z. Tokaji, L. Keszthelyi, and W. Stoeckenius. Alternative translocation of protons and halide ions by bacteriorhodopsin. *PNAS*, 88:4751–4755, 1991. 30
- [253] J. le Coutre, M. Rüdiger, D. Oesterhelt, and K. Gerwert. FTIR investigation of the blue to acid-purple transition of Bacteriorhodopsin by use of induced halide binding. *J. Mol. Struct.*, 349:165–168, 1995. 30
- [254] I. V Kalaidzidis and A. D. Kaulen. Cl⁻-dependent photovoltage responses of bacteriorhodopsin: comparison of the D85T and D85S mutants and wild-type acid purple form. *FEBS Lett.*, 418:239–242, 1997. 30, 31
- [255] L. Kelemen, P. Galajda, S. Száraz, and P. Ormos. Chloride Ion Binding to Bacteriorhodopsin at Low pH: An Infrared Spectroscopic Study. *Biophys. J.*, 76:1951–1958, 1999. 30
- [256] U. Fischer and D. Oesterhelt. Chromophore equilibria in bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 28:211–230, 1979. 30
- [257] P. C. Mowery, R. H. Lozier, Q. Chae, Y.-W. Tseng, M. Taylor, and W. Stoeckenius. Effect of acid pH on the absorption spectra and photoreactions of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 18:4100–4107, 1979. 30
- [258] L. A. Drachev, A. D. Kaulen, L. V. Khitrina, and V. P. Skulachev. Fast Stages of Photoelectric Processes in Biological Membranes: Bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.*, 117:461–470, 1981. 30
- [259] I. Szundi and W. Stoeckenius. Purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin in a neutral lipid environment. *Biophys. J.*, 54:227–232, 1988. 30
- [260] M. P. Heyn, C. Dudda, H. Otto, F. Seiff, and I. Wallat. The purple to blue transition of bacteriorhodopsin is accompanied by a loss of the hexagonal lattice and a conformational change. *Biochemistry*, 28:9166–9172, 1989. 30
- [261] R. Renthal, K. Shuler, and R. Regalado. Control of bacteriorhodopsin color by chloride at low pH - Significance for the proton pump mechanism. *BBA*, 1016:378–384, 1990. 30
- [262] A. Dér, R. Tóth-Boconádi, L. Keszthelyi, and W. Stoeckenius. Bacteriorhodopsin as a possible chloride pump. *FEBS Lett.*, 259:24–26, 1989. 30
- [263] J. Hufen, M. Sugihara, and V. Buss. How the Counterion Affects Ground- and Excited-State Properties of the Rhodopsin Chromophore. *J. Phys. Chem. B*, 108:20419–20426, 2004. 30

- [264] T. Kobayashi, M. Terauchi, T. Kouyama, M. Yoshizawa, and M. Taiji. Femtosecond spectroscopy of acidified and neutral bacteriorhodopsin. In S. A. Akhmanov and M. Y. Poroshina, editors, *Laser Applications in Life Sciences*, volume 1403, pages 407–416. SPIE, 1991. 30
- [265] L. Song, M. A. El-Sayed, and J. K. Lanyi. Protein catalysis of the retinal subpicosecond photoisomerization in the primary process of bacteriorhodopsin photosynthesis. *Science*, 261:891–894, 1993. 30, 63
- [266] Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Joseph W. Lauher, 2006. <http://www.sunysb.edu/chemistry/molecules/aa.html> (9 Nov. 2006). 31
- [267] J. Tittor, U. Schweiger, D. Oesterhelt, and E. Bamberg. Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. *Biophys. J.*, 67:1682–1690, 1994. 31, 33, 34, 48
- [268] J. Sasaki, L. S. Brown, Y.-S. Chon, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Conversion of Bacteriorhodopsin into a Chloride Ion Pump. *Science*, 269:73–75, 1995. 31, 33, 34
- [269] L. S. Brown, R. Needleman, and J. K. Lanyi. Interaction of Proton and Chloride Transfer Pathways in Recombinant Bacteriorhodopsin with Chloride Transport Activity: Implications for the Chloride Translocation Mechanism. *Biochemistry*, 35:16048–16054, 1996. 31, 34
- [270] S. Rouhani, J. P. Cartailier, M. T. Facciotti, P. Walian, R. Needleman, J. K. Lanyi, R. M. Glaeser, and H. Luecke. Crystal structure of the D85S mutant of bacteriorhodopsin: Model of an O-like photocycle intermediate. *J. Mol. Biol.*, 313:615–628, 2001. 31, 32
- [271] M. T. Facciotti, V. S. Cheung, D. Nguyen, S. Rouhani, and R. M. Glaeser. Crystal structure of the bromide-bound D85S mutant of bacteriorhodopsin: Principles of ion pumping. *Biophys. J.*, 85:451–458, 2003. 31, 33, 62, 65, 66, 67
- [272] M. T. Facciotti, V. S. Cheung, C. S. Lunde, S. Rouhani, N. S. Baliga, and R. M. Glaeser. Specificity of anion binding in the substrate pocket of bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 43:4934–4943, 2004. 31, 66
- [273] S. G. Taneva, F. M. Goñi, N. P. Tuparev, I. Petkanchin, A. Dér, and A. Muga. Effect of Asp85 replacement by Thr on the conformation, surface electric properties and stability of bacteriorhodopsin. *Coll. Surf. A: Physiochem. Engin. Asp.*, 209:193–200, 2002. 31
- [274] A. Parsegian. Energy of an Ion crossing a Low Dielectric Membrane: Solutions to Four Relevant Electrostatic Problems. *Nature*, 221:844–846, 1969. 32

- [275] B. Honig and W. L. Hubbell. Stability of "salt bridges" in membrane proteins. *PNAS*, 81:5412–5416, 1984. 32
- [276] J. K. Lanyi. Photochromism of Halorhodopsin. *J. Biol. Chem.*, 261:14025–14030, 1986. 33, 36
- [277] T. Marti, S. J. Rosselet, H. Otto, M. P. Heyn, and H. G. Khorana. The retinylidene Schiff base counterion in bacteriorhodopsin. *J. Biochem.*, 266:18674–18683, 1991. 33
- [278] G. J. Turner, L. J. W. Miercke, T. E. Thorgeirsson, D. S. Kliger, M. C. Betlach, and R. M. Stroud. Bacteriorhodopsin D85N: Three spectroscopic species in equilibrium. *Biochemistry*, 32:1332–1337, 1993. 33
- [279] I. Logunov and K. Schulten. Quantum chemistry of in situ retinal: Study of the spectral properties and dark adaptation of bacteriorhodopsin. In *Proceedings of the Ecole de Physique des Houches*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1995. 33
- [280] J. Tittor, D. Oesterhelt, and E. Bamberg. Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85,96N as proton pumps. *Biophys. Chem.*, 56:153–157, 1995. 34
- [281] J. K. Lanyi, J. Tittor, G. Váró, G. Krippahl, and D. Oesterhelt. Influence of the Size and Protonation State of Acidic Residue-85 on the Absorption-Spectrum and Photoreaction of the Bacteriorhodopsin Chromophore. *BBA*, 1099:102–110, 1992. 34
- [282] S. Paula, J. Tittor, and D. Oesterhelt. Roles of cytoplasmic arginine and threonine in chloride transport by the bacteriorhodopsin mutant D85T. *Biophys. J.*, 80:2386–2395, 2001. 34, 35, 36
- [283] M. Rüdiger, J. Tittor, K. Gerwert, and D. Oesterhelt. Reconstitution of Bacteriorhodopsin from the Apoprotein and Retinal Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 36:4867–4874, 1997. 35
- [284] J. K. Lanyi and H. J. Weber. Spectrophotometric identification of the pigment associated with light- driven primary sodium translocation in Halobacterium halobium. *J. Biol. Chem.*, 255:243–250, 1980. 36
- [285] P. Rath, T. Marti, S. Sonar, H. G. Khorana, and K. J. Rothschild. Hydrogen bonding interactions with the Schiff base of bacteriorhodopsin. Resonance Raman spectroscopy of the mutants D85N and D85A. *J. Biol. Chem.*, 268:17742–17749, 1993. 36
- [286] J.-C. Diels and W. Rudolph. *Ultrashort laser pulse phenomena*. Academic Press, San Diego, 1996. 37

- [287] W. Demtröder, editor. *Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken*. Springer Verlag, Berlin, 2000. 37
- [288] T. Wilhelm, J. Piel, and E. Riedle. Sub-20-fs Pulses Tunable Across the Visible from a Blue-Pumped Single-Pass Noncollinear Parametric Converter. *Opt. Lett.*, 22(19):1494–1496, 1997. 38
- [289] T. Wilhelm. *Spektroskopie auf der 10 fs-Zeitskala: Abstimmbare, sichtbare Lichtimpulse durch nichtkollineare parametrische Verstärkung und Untersuchung der S_1 -Dynamik von Azulen*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1998. 38
- [290] G. Cerullo, M. Nisoli, and S. De Silvestri. Generation of 11 fs Pulses tunable across the Visible by Optical Parametric Amplification. *Appl. Phys. Lett.*, 71(25):3616–3618, 1997. 38
- [291] S. Lochbrunner, T. Wilhelm, J. Piel, P. Huppmann, S. Spörlein, and E. Riedle. Tunable visible and NIR parametric amplifiers at 1 kHz and pulse lengths down to 10 fs. *Ultrafast Phenomena XI, Springer Series in Chem. Physics*, pages 57 – 59, 1998. 38
- [292] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Spörlein, and W. Zinth. Generation of 10 to 50-fs pulses tunable through all of the visible and the NIR. *Appl. Phys. B*, 71:457–465, 2000. 38
- [293] G. Cerullo and S. De Silvestri. Ultrafast optical parametric amplifiers. *Rev. Sci. Instr.*, 74:1–18, 2003. 38
- [294] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, and P. Gilch. A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy. *Appl. Phys. B*, 76:809–814, 2003. 38, 40
- [295] B. Schmidt. Femtosekundenfluoreszenzspektroskopie mit Hilfe des Kerr-Effekts-Entwicklung und Charakterisierung. Master’s thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001. 38, 40
- [296] B. Schmidt. *Femtosekunden-Fluoreszenzspektroskopie photoisomerisierender Moleküle*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004. 40
- [297] B. Schmidt, C. Sobotta, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, and P. Gilch. Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1706:165–173, 2005. 40

-
- [298] S. Spörlein. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001. 40, 42, 49
- [299] R. Huber. *Elektronentransfer an Farbstoff-Halbleiter-Grenzflächen*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002. 40, 42
- [300] C. Root. *Femtosekundenspektroskopie der Chromophordynamik von wasserlöslichen Azopeptiden*. Master's thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002. 40, 42
- [301] H. Satzger. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeitspektroskopie*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004. 40, 42
- [302] H. Satzger, C. Root, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl, and W. Zinth. Picosecond Dynamics in Water Soluble Azobenzene-Peptides. *Chem. Phys. Lett.*, 396:191–197, 2004. 40, 42
- [303] R. Huber, H. Satzger, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF₂. *Opt. Commun.*, 194:443–448, 2001. 41
- [304] Seel M., E. Wildermuth, and W. Zinth. A multichannel detection system for application in ultra-fast spectroscopy. *Measurement Science & Technology*, 8(4):449–452, 1997. 42
- [305] E. Baigar. *Femtosekundenspektroskopie an Farbstofflösungen: Dynamischer Stokes-Shift, Elektronentransfer und Wellenpaketbewegungen*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004. 42
- [306] A. Peine. *Schwingungswellenpakete und Elektronentransfer an Oxazin1 - Lösungsmittleinflüsse*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005. 42, 95
- [307] R. L. Fork, O. Martinez, and J. Gordon. Negative dispersion using pairs of prisms. *Opt. Lett.*, 9:150–152, 1984. 42
- [308] E. B. Treacy. Optical pulse compression with diffraction gratings. *IEEE J. Quant. Electr.*, QE-5:454–458, 1969. 42
- [309] R. L. Fork, C. H. Brito Cruz, P. C. Becker, and C. V. Shank. Compression of optical pulses to six femtoseconds by using cubic phase compensation. *Opt. Lett.*, 12:483–485, 1987. 42

- [310] A. M. Weiner, J. P. Heritage, and E. M. Kirschner. High-resolution femtosecond pulse shaping. *J. Opt. Soc. Am. B.*, 5:1563–1572, 1988. 43
- [311] A. M. Weiner, D. E. Leaird, J. S. Patel, and J. R. Wullert. Programmable femtosecond pulse shaping by use of a multielement liquid-crystal phase modulator. *Opt. Lett.*, 15:326–328, 1990. 43
- [312] A. M. Weiner. Femtosecond Optical Pulse Shaping And Processing. *Prog. Quant. Electr.*, 19:161–237, 1995. 43
- [313] A. M. Weiner. Femtosecond pulse shaping using spatial light modulators. *Rev. Sci. Instrum.*, 71:1929–1960, 2000. 43
- [314] V. Konjaev. Gezielte Manipulation von Amplitude und Phase von Femtosekunden-Lichtpulsen. Master’s thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002. 44
- [315] J. Neuhaus. Analysis and Control of Femtosecond Pulses – Manipulation of Femtosecond Light Pulses with Dispersive Elements and Liquid Crystal Modulators. Master’s thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004. 44
- [316] T. Feurer, A. Glass, and R. Sauerbrey. Two-photon photoconductivity in SiC photodiodes and its application to autocorrelation measurements of femtosecond optical pulses. *Appl. Phys. B*, 65:295–297, 1997. 45
- [317] R. Trebino and K. J. Kane. Using phase retrieval to measure the intensity and phase of ultrashort pulses: frequency-resolved optical gating. *J. Opt. Soc. Am. A*, 10:1101–1111, 1993. 45
- [318] R. Trebino, K. W. DeLong, D. N. Fittinghoff, J. N. Sweetser, M. A. Krumbügel, B. A. Richman, and K. J. Kane. Measuring ultrashort laser pulses in the time-frequency domain using frequency-resolved optical gating. *Rev. Sci. Instrum.*, 68:3277–3295, 1997. 45
- [319] S. Lochbrunner, P. Huppmann, and E. Riedle. Crosscorrelation measurements of ultrashort visible pulses: comparison between nonlinear crystals and SiC photodiodes. *Opt. Comm.*, 184:321–328, 2000. 45
- [320] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymology*, 31:667–678, 1974. 47
- [321] J. A. W. Heymann, W. A. Havelka, and D. Oesterhelt. Homologous overexpression of a light-driven anion pump in an archaebacterium. *Mol. Microbiol.*, 7:623–630, 1993. 48

-
- [322] C. Sobotta, M. Braun, J. Tittor, D. Oesterhelt, and W. Zinth. Influence of the charge at D85 on the initial steps in the photocycle of bacteriorhodopsin. *in preparation*. 48, 68
- [323] M. Braun, C. Sobotta, R. Dürr, H. Pulvermacher, and S. Malkmus. Analysis of wave packet motion in frequency and time domain: oxazin 1. *J. Phys. Chem. A*, 2006. 49, 98
- [324] A. Savitzky and M. J. E. Golay. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analyt. Chem.*, 36:1627–1639, 1964. 49
- [325] A. Maeda, T. Iwasa, and T. Yoshizawa. Formation of 9-*cis* and 11-*cis*-Retinal Pigments from Bacteriorhodopsin by Irradiating Purple Membrane in Acid. *Biochemistry*, 19:3825–3831, 1980. 65
- [326] M. Nonella. Electrostatic protein-chromophore interactions promote the all-trans \rightarrow 13-*cis* isomerization of the protonated retinal Schiff base in Bacteriorhodopsin: An ab initio CASSCF/MRCI study. *J. Phys. Chem. B*, 104:11379–11388, 2000. 69
- [327] M. L. Horng, J. A. Gardecki, A. Papazyan, and M. Maroncelli. Subpicosecond Measurement of Polar Solvation Dynamics: Coumarin 153 Revisited. *J. Phys. Chem.*, 99:17311–17337, 1095. 72
- [328] M. Glasbeek and H. Zhang. Femtosecond Studies of Solvation and Intramolecular Configurational Dynamics of Fluorophores in Liquid Solution. *Chem. Rev.*, 104:1929–1954, 2004. 72
- [329] D. Abramavicius, V. Gulbinas, L. Valkunas, Y.-J. Shiu, K. Liang, M. Hayaishi, and S. Lin. Molecular Twisting and Relaxation in the Excited State of Triarylpyrylium Cations. *J. Phys. Chem. A*, 106:8864–8869, 2002. 72
- [330] Y.-C. Lu, C. Chang, and E. W.-G. Diau. Femtosecond fluorescence dynamics of *trans*-azobenzene in hexane on excitation to the $s_1(n, \pi^*)$ state. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)*, 49:693–701, 2002. 72
- [331] B. Schmidt, C. Sobotta, S. Malkmus, S. Laimgruber, M. Braun, W. Zinth, and P. Gilch. Femtosecond Fluorescence and Absorption Dynamics of an Azobenzene with a Strong Push-Pull Substitution. *J. Phys. Chem. A*, 108:4399–4404, 2004. 72
- [332] S. A. Kovalenko, R. Schanz, V. M. Farztdinov, H. Hennig, and N. P. Ernsting. Femtosecond Relaxation of Photoexcited Para-Nitroaniline: Solvation, Charge Transfer, Internal Conversion and Cooling. *Chem. Phys. Lett.*, 323:312–322, 2000. 72

- [333] D. Markovitsi, H. Sigal, C. Ecoffet, P. Millie, F. Charra, C. Fiorini, J.-M. Nunzi, H. Strzelecka, M. Veber, and C. Jallabert. Charge transfer in triaryl pyrylium cations. Theoretical and experimental study. *Chem. Phys.*, 182:69–80, 1994. 72
- [334] S.-P. Jiang, S.-H. Lian, K.-C. Ruan, L.-K. Hui, S.-H. Liu, Z. Zhang, and Q. Li. Two-photon excitation of proteins. *Chem. Phys. Lett.*, 104:109–111, 1984. 72
- [335] H. Polland, M. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt. Energy transfer from retinal to amino acids - a time-resolved study of the ultraviolet emission of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 851:407–415, 1986. 73
- [336] S. L. Logunov, V. V. Volkov, M. Braun, and M. A. El-Sayed. The relaxation dynamics of the excited electronic states of retinal in bacteriorhodopsin by two-pump-probe femtosecond studies. *PNAS*, 98:8475–8479, 2001. 73
- [337] B. Hou, N. Friedman, S. Ruhman, M. Sheves, and M. Ottolenghi. Ultrafast Spectroscopy of the Protonated Schiff Bases of Free and C₁₃=C₁₄ Locked Retinals. *J. Phys. Chem. B*, 105:7042–7048, 2001. 79
- [338] W. Zinth, A. Sieg, P. Huppmann, T. Blankenhorn, D. Oesterhelt, and M. Nonella. Femtosecond spectroscopy and model calculations for an understanding of the primary reaction in bacteriorhodopsin. *Ultrafast Phenomena XII, Springer Series in Chem. Physics 66*, pages 680 – 682, 2000. 79, 86, 87
- [339] T. Ye, B. Hou, E. Gershgoren, M. Ottolenghi, N. Friedman, M. Sheves, and S. Ruhman. Resolving the primary dynamics of bacteriorhodopsin, and Locked analogs in the reactive excited state. *Ultrafast Phenomena XII, Springer Series in Chem. Physics 66*, pages 683–685, 2000. 79
- [340] W. T. Pollard, C. H. Brito Cruz, C. V. Shank, and R. A. Mathies. Direct observation of the excited-state *cis-trans* photoisomerization of bacteriorhodopsin: Multilevel line shape theory for femtosecond dynamic hole burning and its application. *J. Chem. Phys.*, 90:199–208, 1989. 85
- [341] P. Brumer and M. Shapiro. Control of unimolecular reactions using coherent-light. *Chem. Phys. Lett.*, 126:541–546, 1986. 92
- [342] P. Brumer and M. Shapiro. Laser control of molecular processes. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 43:257–282, 1992. 92
- [343] P. Brumer and M. Shapiro. Quantum interference in the control of molecular processes. *Philosophical Transactions Royal Soc. London Series A-mathematical Phys. Engineering Sciences*, 355:2409–2412, 1997. 92
- [344] P. Brumer and M. Shapiro. Quantum coherence in the control of molecular processes. *Laser Particle Beams*, 16:599–603, 1998. 92

-
- [345] M. Shapiro and P. Brumer. Quantum control of chemical reactions. *J. Chem. Society-faraday Transactions*, 93:1263–1277, 1997. 92
- [346] M. Shapiro and P. Brumer. Quantum control of dynamics. *Multiphoton Processes 1996*, pages 231–247, 1997. 92
- [347] M. Shapiro and P. Brumer. Coherent control of molecular dynamics. *Reports On Progress In Phys.*, 66:859–942, 2003. 92
- [348] M. Shapiro and P. Brumer, editors. *Principles of the Quantum Control of Molecular Processes*. Wiley, Hoboken, New Jersey, 2003. 92
- [349] S. A. Rice, D. J. Tannor, and R. Kosloff. Coherent pulse sequence induced control of selectivity of reactions - exact quantum-mechanical calculations. *J. Chem. Society-faraday Transactions II*, 82:2423–2444, 1986. 92
- [350] D. J. Tannor and S. A. Rice. Control of selectivity of chemical-reaction via control of wave packet evolution. *J. Chem. Phys.*, 83:5013–5018, 1985. 92
- [351] D. J. Tannor, R. Kosloff, and S. A. Rice. Coherent pulse sequence induced control of selectivity of reactions - exact quantum-mechanical calculations. *J. Chem. Phys.*, 85:5805–5820, 1986. 92
- [352] D. J. Tannor and S. A. Rice. Coherent pulse sequence control of product formation in chemical-reactions. *Adv. In Chem. Phys.*, 70:441–523, 1988. 92
- [353] R. S. Judson. Teaching Lasers to Control Molecules. *Phys. Rev. Lett.*, 68:1500–1503, 1992. 93
- [354] W. S. Warren, H. Rabitz, and M. Dahleh. Coherent control of quantum dynamics - the dream is alive. *Science*, 259:1581–1589, 1993. 93
- [355] B. Amstrup, G. J. Tóth, G. Szabó, H. Rabitz, and A. Lőrincz. Genetic Algorithm with Migration on Topology Conserving Maps for Optimal Control of Quantum Systems. *J. Phys. Chem.*, 99:5206–5213, 1995. 93
- [356] H. Rabitz, R. de Vivie-Riedle, M. Motzkus, and K. Kompa. Chemistry - Whether the future of controlling quantum phenomena? *Science*, 288:824–828, 2000. 93
- [357] H. Rabitz. Shaped Laser Pulses as Reagents. *Science*, 299:525–52, 2003. 93
- [358] I. Walmsley and H. Rabitz. Quantum Physics Under Control. *Physics Today*, 56:43–49, 2003. 93
- [359] D. E. Goldberg, editor. *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*. Addison-Wesley Professional, Boston, San Francisco, New York, 1989. 94

- [360] M. Seel, S. Engleitner, and W. Zinth. Wavepacket motion and ultrafast electron transfer in the system oxazine 1 in n,n-dimethylaniline. *Chem. Phys. Lett.*, 275:363369, 1997. 95, 102
- [361] M. Seel. *Femtosekundenspektroskopie an Oxazin 1, Wellenpaketbewegungen und ultraschneller Elektronentransfer*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1997. 95
- [362] S. Engleitner. *Schwingungskohärenzen beim ultraschnellen Elektrontransfer von N,N-Dimethylanilin zu Oxazin 1*. PhD thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 1998. 95
- [363] P. Gilch, E. Baigar, H. Pulvermacher, and W. Zinth. Femtosecond wavepacket motion and fastest electron transfer reaction. In S. Califano, P. Foggi, and R. Righini, editors, *Recent advances in ultrafast spectroscopy, Proceedings of the XII UPS Conference*, pages 145–154, Firenze, 2001. 95, 102
- [364] R. Sens and K. Drexhage. Fluorescence quantum yield of oxazine and carbazine laser dyes. *J. Luminescence*, 24/25:709712, 1981. 95
- [365] R. Dürr. Kontrolle vibronischer Wellenpakete in Oxazin 1. Master’s thesis, Fakultät für Physik der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004. 98
- [366] S. Malkmus, R. Dürr, C. Sobotta, H. Pulvermacher, W. Zinth, and M. Braun. Chirp dependence of wave packet motion in oxazine 1. *J. Phys. Chem. A*, 109:10488–10492, 2005. 98, 101
- [367] S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakov, J. Ruthmann, and N. P. Ernsting. Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing. *Phys. Rev. A*, 59:2369–2383, 1999. 100
- [368] C. J. Bardeen, Q. Wang, and C. V. Shank. Selective excitation of vibrational wavepacket motion using chirped pulses. *Phys. Rev. Lett.*, 75(19):34103413, 1995. 103
- [369] C. J. Bardeen, Q. Wang, and C. V. Shank. Femtosecond Chirped Pulse Excitation of Vibrational Wave Packets in LD690 and Bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem. A*, 1998:2759–2766, 1998. 103
- [370] M. Abe, Y. Ohtsuki, Y. Fujimura, and W. Domcke. Optimal control of ultrafast cis-trans photoisomerization of retinal in rhodopsin via a conical intersection. *J. Chem. Phys.*, 123:144508, 2005. 106
- [371] S. C. Flores and V. S. Batista. Model study of coherent-control of the femtosecond primary event of vision. *J. Phys. Chem. B*, 108:6745–6749, 2004. 106

Lebenslauf

Veröffentlichungen

- N. Fertig, M. George, M. Klau, C. Meyer, A. Tilke, C. Sobotta, R. H. Blick, J. C. Behrends, Microstructured Apertures in Planar Glass Substrates for Ion Channel Research, *Receptors and Channels*, **9**, 29-40 (2003).
- B. Schmidt, C. Sobotta, S. Malkmus, S. Laimgruber, M. Braun, W. Zinth, P. Gilch, *J. Phys. Chem. A*, Femtosecond Fluorescence and Absorption Dynamics of an Azobenzene with a Strong Push-Pull Substitution, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 4399-4404 (2004).
- P. Gilch, B. Schmidt, C. Sobotta, M. Braun, F. Koller, T. Schrader, A. Sieg, W. Schreier, W. Zinth, Monitoring an ultrafast photo-isomerization by femtosecond fluorescence, absorption, and IR spectroscopy, *Ultrafast Phenomena XIV*, T. Kobayashi, T. Okada, T. Kobayashi, K. Nelson, S. De Silvestri, eds. (Springer-Verlag, Berlin, 465-467 (2005).
- B. Schmidt, C. Sobotta, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, P. Gilch, Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy, *BBA*, **1706**, 165-173 (2005).
- S. Malkmus, R. Dürr, C. Sobotta, H. Pulvermacher, W. Zinth, M. Braun, Chirp Dependence of Wave Packet Motion in Oxazine 1, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 10488-10492 (2005).
- M. Braun, C. Sobotta, R. Dürr, H. Pulvermacher, S. Malkmus, Analysis of Wave Packet Motion in Frequency and Time Domain: Oxazine 1, *J. Phys. Chem. A*, **110**, 9793-9800 (2006).
- C. Sobotta, M. Braun, J. Tittor, D. Oesterhelt, W. Zinth, Influence of the charge at D85 on the initial steps in the photocycle of bacteriorhodopsin, in preparation.
- F. Koller, C. Sobotta, T. Schrader, W. Schreier, A. Sieg, P. Gilch, Surprisingly Slow IR Transients of an Ultrafast Photo-Isomerisation, in preparation.

Beiträge zu Fachtagungen und internationalen Konferenzen

- C. Sobotta, B. Schmidt, S. Malkmus, S. Laimgruber, M. Braun, P. Gilch, „Distinguishing ultrafast motion on the excited state surface from internal conversion in push-pull azobenzene”, European Science Foundation ULTRA School on „Ultrafast Processes In Photochemistry And Photobiology” 2003, Torún, Polen, Poster.
 - R. Dürr, C. Sobotta, S. Malkmus, M. Braun, W. Zinth, „Influence of Linear Chirped Excitation Pulses on the Wavepacket Motion in the Dye Oxazine 1”, DPG Frühjahrstagung des Arbeitskreises Atome, Moleküle, Quantenoptik und Plasmen (AMOP) 2004, München, Poster.
 - C. Sobotta, B. Schmidt, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, P. Gilch, W. Zinth, „Excitation intensity dependence of femtosecond fluorescence signatures of wild-type bacteriorhodopsin”, 11th International Conference On Retinal Proteins 2004, Frauenchiemsee, Deutschland, Poster.
 - C. Sobotta, B. Schmidt, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun P. Gilch, W. Zinth, „Excitation intensity dependence of femtosecond fluorescence signatures of wild-type bacteriorhodopsin”, Dynamics of Proteins 2004, Freising, Deutschland, Poster.
- R. Dürr, C. Sobotta, S. Malkmus, M. Braun, W. Zinth, „Influence of Linear Chirped Excitation Pulses on the Wavepacket Motion in the Dye Oxazine 1”, Dynamics of Proteins 2004, Freising, Deutschland, Poster.
- C. Sobotta, B. Schmidt, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun P. Gilch, W. Zinth, „Ultrafast Fluorescence Spectroscopy on Bacteriorhodopsin”, Dynamics of Proteins 2004, Freising, Deutschland, Vortrag.
- C. Sobotta, B. Schmidt, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, P. Gilch, J. Wachtveitl, W. Zinth, „Femtosecond fluorescence signatures of bacteriorhodopsin and proteorhodopsin”, CLEO/Europe- EQEC 2005, München, Vortrag.
 - C. Sobotta, M. Braun, J. Tittor, W. Zinth, „Primäre Dynamik der Mutante D85T des Transmembranproteins Bakteriorhodopsins”, DPG Frühjahrstagung des Arbeitskreises Atome, Moleküle, Quantenoptik und Plasmen (AMOP) 2006, Frankfurt, Vortrag.

Danksagung

Abschließend möchte ich noch all denjenigen danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen und mich in dieser Zeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth für seine intensive Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Er gab mir die Möglichkeit in vielfältigen hochinteressanten Projekten und verschiedenen Laboren zu arbeiten, vor allem an seinem schier unendlich großen Wissensschatz über BR in zahlreichen Diskussionen teilzuhaben und dadurch sehr viel lernen zu können.

Prof. Dr. Hermann Gaub für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Eberhard Riedle für seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei Fragen.

PD Dr. Peter Gilch für seine sehr engagierte Betreuung und Unterstützung beim Nitroazo-Projekt sowie sein stets offenes Ohr bei azofremden Projekten.

Dr. Jörg Tittor für die Bereitstellung von BR-Proben und mutierten Proben in gewünschter OD und Pufferlösung, für die Retinalextraktion an den vier Mutanten. Sowie für viele fruchtbare Diskussionen, so dass ich an seinem profunden Wissen partizipieren konnte.

Labor z18: Dr. Markus Braun für seine umfassende Einführung in Optik und Laser, die er mit viel Freude und Elan gegeben hat. Meinem Vorgänger **Dr. André Peine**, der mir das Druidenwissen des Baigarschen Oszillators und Verstärkers vermittelte, für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit im z18. Meiner Diplomandin **Regina Dürr** für ihre tatkräftige Mithilfe im Labor.

Labor z20: der sichtbaren Seite **Dr. Christopher Root** und **Dr. Helmut Satzger** für die Einweisung in die z20 Anlage, um meine Experimente selbstständig durchzuführen, sowie für sofortige Hilfe bei IDL-Fragen. Der dunklen Seite **Wolfgang Schreier**, **Florian Koller** und **Tobias Schrader** für die freundliche Aufnahme ins Labor und für uneigennützig Hilfe. **Dr. Arne Sieg** für das Weitergeben der Probenhandhabung von BR.

Labor z21: Dr. Bernhard Schmidt für die sehr gute Zusammenarbeit beim Nitroazo- und BR-Fluoreszenzprojekt sowie den experimentellen Ausflug in die Fluoreszenzspektroskopie. **Stefan Laimgruber** für seine diversen Tipps Schiebeküvetten

abzudichten. Beiden für die ideale Arbeitsgruppe.

Dr. Horst Pulvermacher für seine Berechnungen an Oxazin und dass er sich immer auf meine nächsten Messdaten gefreut hat.

Werkstatt: Rudi Schwarz, Alfons Stork, Christian Hausmann für die schnelle Erledigung von Aufträgen und speziellen Maßanfertigungen, so dass ich bei meiner Körpergröße alles erreichen konnte. Jörg Krebs und Harald Hoppe für die Unterstützung bei chemischen und optischen Fragen.

Sekretariat: Frau Michaelis, Frau Podolski und Frau Widmann-Diermeier, für ihre große Hilfsbereitschaft und dass sie mich sicher durch den bürokratischen Dschungel geleitet haben.

Prof. Arkadij Yartsev for the most extended and fruitful poster discussion at a conference.

Computer-Administratoren: Dr. Karl-Heinz Mantel, Dr. Peter Baum, Dr. Arne Sieg und Dr. Bernhard Schmidt, mit denen die Zusammenarbeit als Administratorin sehr viel Spaß gemacht hat.

Dem gesamten **Institut für BioMolekulare Optik** für die angenehme und freundliche Atmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft und die gemeinsamen Mensgänge, insbesondere **Stefan Berner, Michael Brandl, Thomas Brust, Thorben Cordes, Simone Draxler, Karin Haiser, Björn Heinz, Dr. Birgit von Holt, Markus Huber, Florian Lederer, Markus Lipp, Stephan Malkmus, Evelyn Plötz, Andrea Rau, Nadja Regner, Rossana Reho, Hilmar Schachenmayr, Thomas Schmierer, Verena Schultheis, Dr. Kai Stock.**

Den **Korrekturlesern:** Sr. Barbara Flad, Dr. Heidi Kögel, Karen Saucke und Dr. Jana Traupel.

Prof. Dr. Bianca Hermann für ihren Kurs „Dissertationen, Diplomarbeiten schreiben“, der mir geholfen hat, sehr zügig meine schriftliche Arbeit zu erstellen.

Dr. Birgit von Holt, Rossana Reho, Dr. Christopher Root, Karen Saucke, Dr. Bernhard Schmidt, Wolfgang Schreier, Verena Schultheis, Dr. Arne Sieg, Dr. Kai Stock, Dr. Jana Traupel, die während meines Studiums und meiner Promotion zu Freunden geworden sind.

Meiner Familie, für die ich mich inzwischen in absolut unverständlichen physikalischen Sphären befinde, für ihren liebevollen Rückhalt und ihre Unterstützung.

Meine physikalische **Ausbildung** verdanke ich:

Prof. Dr. Wolfgang Beck, Prof. Dr. Christoph Bräuchle, Prof. Dr. Jan C. Behrends, Prof. Dr. Robert H. Blick, Prof. Dr. Detlef Dürr, Prof. Dr. Jochen Feldmann, Prof. Dr. Harald Fritzsche, Prof. Dr. Mingyuan Gao, Prof. Dr. Dietrich Habs, Prof. Dr. Jörg Kotthaus, Prof. Dr. Walter Richert, Prof. Dr. Axel Schenzle, Prof. Dr. Georg Schlüchtermann, Dr. Sigmund Stintzing, Prof. Dr. Wilhelm Stocker, Prof. Dr. Paul Tavan, Prof. Dr. Herbert Wagner, Prof. Dr. Herbert Walther, Prof. Dr. Julius Wess, Prof. Dr. Hermann Wolter, Prof. Dr. Andreas Zumbusch, Prof. Dr. Wilhelm Zwerger.