

Molekulare Mechanismen in mikrobiellen Retinalproteinen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Peter Eberhardt
aus
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2019
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der

Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan Prof. Dr. Clemens Glaubitz
1. Gutachter Prof. Dr. Josef Wachtveitl
2. Gutachter Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Datum der Disputation: _____

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	1
I Theoretische Grundlagen	3
2 Theoretischer Hintergrund	5
2.1 Grundlagen der optischen Spektroskopie	5
2.2 Datenanalyse	9
2.2.1 Global Lifetime Analysis	10
2.2.2 Lifetime Distribution Analysis	11
2.2.3 Target Analysis	12
2.3 Retinalproteine	14
II Experimentelle Methoden	19
3 Anlagen und Programme	21
3.1 Blitzlichtphotolyse	21
3.1.1 Laser Pump-Lichtquelle	21
3.1.2 Breitband-Blitzlichtphotolyse	23
3.1.3 Transiente Blitzlichtphotolyse	26
3.1.4 Datenaufzeichnung & -verarbeitung	28
3.2 Ultraschnelle Transiente Absorptionsspektroskopie	38
3.2.1 Laser Pump-Lichtquelle	38
3.2.2 Der Messaufbau	39
III Ergebnisse	41
4 Channelrhodopsin 2	43
4.1 Einleitung	43
4.2 9,12-Phenylretinal	46
4.3 <i>Trans</i> -Locked Retinal	49

4.4	Diskussion & Ausblick	52
5	<i>Krokinobacter Eikastus</i> Rhodopsin 2	55
5.1	Einleitung	56
5.2	Primärreaktion des KR2	57
5.2.1	Wildtyp	57
5.2.2	H30A	63
5.2.3	L120Q	66
5.2.4	A2 Retinal	68
5.2.5	MMA Retinal	71
5.2.6	Zusammenfassung & Diskussion	75
5.3	Langzeitdynamik des KR2	79
5.3.1	Verhalten bei verschiedenen pH- und Salzbedingungen	80
5.3.2	Einfluss der Umgebung auf den Photozyklus des KR2	84
	KR2 in Nanodisks	85
5.3.3	Temperaturabhängigkeit des KR2 Wildtyps	87
5.3.4	Tieftemperaturmessungen an KR2	99
5.3.5	Zusammenfassung & Diskussion	102
IV	Zusammenfassung	105
6	Zusammenfassung	107
	Literaturverzeichnis	111
	Abbildungsverzeichnis	125
	Tabellenverzeichnis	129
	Abkürzungsverzeichnis	131
	Eidesstattliche Erklärung	135

Kapitel 1

Einleitung

Alle lebenden Organismen brauchen Energie, zum Beispiel für die Synthese organischer Moleküle, Stofftransport durch Membranen oder mechanische Arbeiten. Viele Organismen haben sich so entwickelt, dass sie Licht als Hauptenergielieferanten nutzen (Photosynthese) und sich mit Hilfe von lichtsensitiven Sensoren an ihre Umgebung anpassen können (Phototaxis). Hierfür werden Photorezeptoren benötigt, diese verdanken ihre Lichtsensitivität den darin gebundenen Chromophoren, die in der Lage sind Licht zu absorbieren. Eines dieser Chromophore ist das Retinal, welches meistens in Rhodopsinen vorkommt. Das Wort Rhodopsin entstammt dem Griechischen und setzt sich aus den Wörtern *rhódon* für Rosé (aufgrund der meist pinken Farbe) und *ópsis* für Sicht zusammen. Rhodopsine übernehmen eine Vielzahl verschiedener Funktionen und können in allen Domänen des Lebens gefunden werden.

Eines dieser Rhodopsine ist das 2013 in einem marinen Flavobakterium entdeckte *Krokinobacter eikastus* Rhodopsin 2. Hierbei handelt es sich um die erste lichtgetriebene auswärts gerichtete Natrium-Ionenpumpe. Dies bedeutet, dass das Membranprotein, nach Lichteinwirkung, Natrium-Ionen von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Membran pumpen kann. Wie alle mikrobiellen Retinalproteine durchläuft auch *Krokinobacter eikastus* Rhodopsin 2 einen Photozyklus, der aus verschiedenen Photointermediaten besteht. Diese können mittels optischer Spektroskopie untersucht und charakterisiert werden. Ein gutes Verständnis des Proteins und seines Photozyklus ist interessant, um es zum Beispiel in der Optogenetik

einzusetzen. Optogenetik ist die Ausnutzung von Licht, um genetisch modifizierte Neuronen, durch Manipulation des Ionen-Gradienten über die Zellmembran, zu aktivieren oder deaktivieren. Optogenetik wurde von *Science* als Durchbruch des Jahrzehnts und von *Nature Methods* zur Methode des Jahres 2010 gewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Retinalproteine untersucht. Zum einen handelt es sich um Channelrhodopsin-2, welches schon seit einigen Jahren in der Optogenetik eingesetzt wird, um Nervenzellen zu aktivieren. Bei dem anderen Retinalprotein handelt es sich um das oben erwähnte *Krokinobacter eikastus* Rhodopsin 2, welches große Hoffnungen für die Optogenetik trägt, da man mit Hilfe dieses Proteins auch in der Lage ist Nervenzellen zu deaktivieren. Beide Proteine wurden mit Hilfe von Ultrakurzzeitspektroskopie sowie Blitzlichtphotolyse untersucht, um Informationen über die Primärreaktion sowie den anschließenden Photozyklus zu erhalten.

Teil I

Theoretische Grundlagen

Kapitel 2

Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel soll das theoretische Hintergrundwissen vermittelt werden, welches benötigt wird, um die folgende Arbeit zu verstehen. Abschnitt 2.1 soll einige Grundlagen zur optischen Spektroskopie erläutern. Diese wurden hauptsächlich Sachbüchern entnommen. [1–3] In Abschnitt 2.2 sollen die verschiedenen Datenauswertungsmethoden für die gemessenen, zeitaufgelösten Signale sowie deren mathematischer Hintergrund dargelegt werden. Zuletzt wird in Abschnitt 2.3 ein Einblick in die Welt der Retinalproteine gegeben.

2.1 Grundlagen der optischen Spektroskopie

Licht ist eine Form von elektromagnetischer Strahlung und besitzt Eigenschaften von Wellen und Teilchen. Dieser Welle-Teilchen-Dualismus lässt sich zum Beispiel durch den photoelektrischen Effekt zeigen, da hier elektromagnetische Strahlung (Photonen) eindeutig Teilcheneigenschaften aufweisen. Die Welle wird meist über die Wellenlänge λ charakterisiert und lässt sich in verschiedene Bereiche, je nach Wellenlänge einteilen. Das daraus resultierende elektromagnetische Spektrum ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Betrachtet man die Energie der elektromagnetischen Strahlung, so wird oft die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ verwendet, welche sich aus dem Kehrwert der Wellenlänge berechnet.

2.1. GRUNDLAGEN DER OPTISCHEN SPEKTROSKOPIE

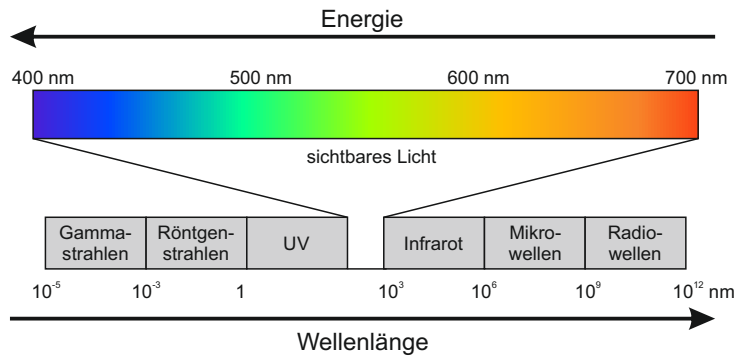


Abbildung 2.1: Bereiche des elektromagnetischen Spektrums.

Wechselwirkt Licht mit Materie, so kann die Energie des Lichts vom Material absorbiert werden. Hierfür muss die Energie des zu absorbierenden Photons (E_{Phot}) mit der Energiedifferenz (ΔE) eines erlaubten Übergangs zwischen einem besetzten und unbesetzten Energieniveau übereinstimmen.

$$\Delta E = E_{Phot} = h \cdot \tilde{\nu} \cdot c = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.1)$$

Hierbei ist c die Lichtgeschwindigkeit und h das Planck'sche Wirkungsquantum. Die Absorption ($A(\lambda)$) eines Materials oder einer Probe lässt sich über das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreiben. Hierfür betrachtet man die Transmission ($T(\lambda)$) welche sich aus dem Vergleich der Intensitäten der einfallenden (I_0) und transmittierten Strahlung (I) berechnet.

$$A(\lambda) = -\log(T(\lambda)) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2.2)$$

Kennt man den molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$, so lässt sich über die Absorption auch die Konzentration der Probe bei bekannter Schichtdicke d berechnen.

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.3)$$

Absorbiert eine Probe ein Photon im ultravioletten oder sichtbaren Spektralbereich, wird es vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen elektronisch angeregten Zustand S_n versetzt. Hierbei wird ein Valenzelektron eines bindenden σ , π oder nichtbindenden n Orbitals in ein antibindendes σ^* oder π^* Orbital angeregt. Diese elektronischen Übergänge sind erlaubt, wenn das Übergangsdipolmoment μ_{ij} , welche die Stärke des elektronischen Übergangs bestimmt, ungleich Null ist.

$$\mu_{ij} = \int \Psi_i^* \mu \Psi_j dr \neq 0 \quad (2.4)$$

Hierbei sind Ψ_i^* und Ψ_j die Wellenfunktionen des angeregten Zustands und des Grundzustands und μ der Dipoloperator. Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang gibt der Einstein-Koeffizient B_{ij} an, welcher aus dem Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments $|\mu_{ij}|^2$ bestimmt werden kann.

$$B_{ij} = \frac{8 \pi^3 G}{3 h^2 e} \cdot |\mu_{ij}|^2 \quad (2.5)$$

e entspricht der Elementarladung und G einem Multiplizitätsfaktor, welcher für Übergänge zwischen Singulettzuständen den Wert 1 annimmt. Das Übergangsdipolmoment $|\mu_{ij}|^2$ wird für die Auswahlregeln in der Spektroskopie genutzt. Ein Übergang ist erlaubt, wenn $|\mu_{ij}|^2 \neq 0$ ist und verboten, wenn $|\mu_{ij}|^2 = 0$ ist. Ein Maß für die Intensität des Übergangs ist durch die Oszillatorstärke f_{ij} gegeben.

$$f_{ij} = \frac{8 \pi^2 m_e \nu_{ij}}{3 h e^2} \cdot |\mu_{ij}|^2 \quad (2.6)$$

Hierbei entspricht m_e der Masse eines Elektrons und ν_{ij} der Übergangsfrequenz. Die Oszillatorstärke f_{ij} ist dimensionslos und proportional zum Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$, sie kann maximal einen Wert von 1 haben. Für einen erlaubten Übergang ist

$f \leq 1$ und für einen verbotenen Übergang $f \ll 1$.

Befindet sich eine Probe im thermischen Gleichgewicht, so wird das Verhältnis der Besetzungszahlen N_i und N_j durch die Boltzmann-Verteilung bestimmt.

$$\frac{N_j}{N_i} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (2.7)$$

Beleuchtet man eine Probe mit Licht, so verringert sich die Besetzungszahl N_i des Zustandes i und erhöht sich die Besetzungszahl des Zustands N_j . Ein angeregtes Molekül geht nun so lange in den energieärmeren Zustand i über, bis die Besetzungszahlen beider Zustände wieder der Boltzmann-Verteilung entsprechen. Dieser Übergang folgt der Kinetik einer Reaktion erster Ordnung:

$$-\frac{dN_n}{dt} = kN_n \quad (2.8)$$

Hierbei ist k die Geschwindigkeitskonstante, welche der Kehrwert der Lebensdauer τ des zugehörigen Zustandes entspricht.

$$k = \frac{1}{\tau} \quad (2.9)$$

Die Lebensdauer eines angeregten Zustandes, zum Beispiel N_j , ist die Zeit die vergeht, bis sich $1/e$ des Ausgangszustandes N_i wiederhergestellt hat.

2.2 Datenanalyse

Zeitaufgelöste optische Spektroskopie ist ein in der Photophysik, Photochemie und Photobiologie weitverbreitetes Werkzeug. Diese wird unter anderem dazu benutzt, Dynamiken von komplexen Systemen zu untersuchen und verstehen. Zu diesen komplexen Systemen zählen unter anderem auch Protein-Chromophor Komplexe, die für Energiegewinnung oder Signalgebung biologischer Systeme unabdingbar sind. Um diese Prozesse zu verstehen, werden die Systeme durch einen externen Stimulus (z.B. Licht) angeregt, um anschließend die Antwort des Systems aufzuzeichnen. Um die wichtigen Informationen, welche in diesen hochkomplexen Messungen enthalten sind, zu extrahieren, müssen verschiedene Datenanalyse-Werkzeuge wie *Global Lifetime Analysis*, *Target Analysis* und *Lifetime Distribution Analysis* genutzt werden, welche im Folgenden erläutert werden sollen. Ziel aller zeitaufgelöster Messungen ist die Offenlegung der Kinetiken der verschiedenen Prozesse, welche in dem gemessenen Zeitfenster in der Probe stattfinden. Der Zerfall eines Zustands eines Moleküls M ist durch die Differentialgleichung erster Ordnung gegeben:

$$\frac{dM'(t)}{dt} = -k_M M'(t) \quad (2.10)$$

Hierbei ist M' der Zustand des Moleküls, t die Zeit und k_M die molekulare Zerfallsrate. Integration von Gleichung 2.10 resultiert in einem monoexponentiellen Zerfall des Zustands.

$$M'(t) = M'_0 \exp(-k_M t) \quad (2.11)$$

M' und M'_0 sind jeweils die Konzentrationen des Zustands zur Zeit t und $t = 0$. k_M ist die molekulare Zerfallsrate und besteht aus allen möglichen Prozessen, die zum Zerfall des Zustands beitragen, wie zum Beispiel die Rückkehr in den Grundzustand oder die Weiterreaktion in einen neuen Zustand. Die Zerfallsrate ist invers

proportional zur Lebensdauer des jeweiligen Zustandes.

2.2.1 Global Lifetime Analysis

Misst man ein zeitaufgelöstes Signal, kann dieses mit n Differenzialgleichungen erster Ordnung (Gleichung 2.10) beschrieben werden. Die Lösung dieses Systems resultiert in einer n -exponentiellen Zerfallskinetik. Misst man die zeitaufgelösten Signale bei m Wellenlängen und analysiert diese unabhängig voneinander, resultiert dies in einer $m \cdot n$ -exponentiellen Zerfallskinetik. Zum Fitten dieser Kinetik benötigt man als Parameter also $n \cdot m$ Raten, sowie $n \cdot m$ zugehörige Amplituden. Um die Anzahl der Fitparameter möglichst gering zu halten, kann man multidimensionale Datensätze auch gleichzeitig und nicht separat voneinander analysieren. Diese Datenanalyse-Technik nennt man *Global Lifetime Analysis*. [4–6] Hierbei wird der Datensatz $S(t)$ durch eine Summe von Exponentialfunktionen mit den zugehörigen Amplituden beschrieben.

$$S(t, \lambda_i) = \sum_{j=1}^n A_j(\tau_j, \lambda_i) \exp(-t/\tau_j) \quad (2.12)$$

$S(t, \lambda_i)$ ist der aufgezeichnete Datensatz, λ_i die Detektionswellenlänge, A_j die prä-exponentielle Amplitude für die Zerfallszeit τ_j . Die einzigen detektionswellenabhängigen Parameter hier sind die Amplituden A_j , da alle Wellenlängen gleichzeitig mit einem einzigen Satz an Lebenszeiten τ_j gefittet werden. Da die Zeitauflösung einer Anlage nicht beliebig schnell sein kann, muss zusätzlich noch die *Instrument Response Function* (IRF) mit berücksichtigt werden. Diese setzt sich aus der Faltung des Anreg- und Abtastpulses und/oder der Detektorantwort zusammen. So ergibt sich aus Gleichung 2.12

$$S(t, \lambda_i) = \sum_{j=1}^n A_j(\tau_j, \lambda_i) \exp(-t/\tau_j) \otimes IRF(t) \quad (2.13)$$

Die präexponentiellen Amplituden A_j sind bestimmten Lebenszeiten τ_j zugeordnet und ergeben gegen die Wellenlänge aufgetragen die zerfallsassoziierten Spektren (*Decay Associated Spectra* (DAS)). Die DAS spiegeln die kinetischen Informationen wieder, welche in der Messung enthalten sind. Da es sich um Zerfallskinetiken handelt, sind die Vorzeichen der Amplituden umgedreht, eine negative Amplitude bedeutet also den Aufbau eines Zustands, während hingegen eine positive Amplitude den Abbau eines Zustands anzeigt. *Global Lifetime Analysis* ist ein modellabhängiges Verfahren, da hier ein diskreter Satz an Lebenszeiten zum Fitten der Daten verwendet wird, welches ein kinetisches Modell voraussetzt. [7]

2.2.2 Lifetime Distribution Analysis

Trotz der weiten Verbreitung und Praktikabilität der *Global Lifetime Analysis* hat auch diese Methode ihre Einschränkungen. Beschäftigt man sich mit komplexeren Systemen und hat zum Beispiel nicht-exponentielle Dynamiken oder Dynamiken mit spektralen Verschiebungen, ist es schwer diese Phänomene nur mit Hilfe der *Global Lifetime Analysis* zu verstehen. Viele dieser Prozesse müssen mit mehreren Lebenszeiten gefittet werden, um die Daten korrekt wiederzugeben, obwohl es sich nur um einen einzigen Prozess handelt. Um solche Prozesse besser zu verstehen, kann die *Lifetime Distribution Analysis* genutzt werden. [8–10] Generell ist die Methode für die Beschreibung der Lebenszeiten ähnlich der *Exponential Series Method* [11], wird jedoch noch um eine Tikhonov Regularisierung [12] erweitert. [8] Diese Methode nutzt eine größere Anzahl an Exponentialfunktionen (meist $n > 50$), mit zeitlich fixen Lebenszeiten τ_n , um die Amplituden A_j für jede Detektionswellenlänge λ_i zu bestimmen. Die Bestimmung der Amplituden A_j (Gleichung 2.13) oder der kontinuierlichen Funktion $\Phi(\tau)$ (Gleichung 2.14) ist äquivalent zu einer inversen Laplace Transformation der gemessenen zeitaufgelösten Signale $S(t)$

$$S(t, \lambda_i) = \int_0^{\infty} \Phi(\tau, \lambda_i) \exp(-t/\tau) d\tau \quad (2.14)$$

Dies jedoch ist ein numerisch instabiles (ill-posed) Problem und kann nicht einfach numerisch gelöst werden. Die Tikhonov Regularisierung hilft hier dabei artifizielle Amplitudenoszillationen, welche unter anderem durch Rauschen verursacht werden können, zu vermeiden, indem sie weitere Bedingungen zum Beispiel an die Glättung stellt.

2.2.3 Target Analysis

Die beiden bisher beschriebenen Methoden führen zu einer mathematisch korrekten Beschreibung des Systems, welche jedoch nicht notwendigerweise physikalische Informationen enthält. Um diese zu extrahieren, muss zum Beispiel ein kinetisches Modell also Grundlage für den Fit der Daten genutzt werden. [13] Diese Herangehensweise wird *Target Analysis* genannt. Zuerst muss das kinetische Modell aufgestellt werden, was normalerweise aus einem System aus Differenzialgleichungen erster Ordnung besteht. Dieses muss jedoch erweitert werden, um auch die IRF mit zu berücksichtigen. [10]

$$\frac{d}{dt}X(t) = TX(t) + \epsilon \cdot IRF(t) \quad (2.15)$$

Hierbei beschreibt $\mathbf{X}(t)$ den zeitabhängigen Vektor der Populationen der Spezies, T die kinetische Transfermatrix und ϵ einen Vektor mit den Startkonzentrationen der Zustände. Die kinetische Transfermatrix T besteht aus:

$$T_{jk} = k_{jk} - \delta_{jk}(k_{jj} + \sum_{m=1}^n k_{mk}) \quad j, k = 1, \dots, n \quad (2.16)$$

mit δ_{jk} als Kronecker-Delta. Die Außerdiagonalelemente der Transfer Matrix T_{jk} beschreiben die Übergangsraten (k_{jk}) zwischen den verschiedenen Zuständen während die Diagonalelemente T_{jk} die Summe aller Zerfallsraten eines Zustandes beschrei-

ben. Das zeitaufgelöste Signal $S(t, \lambda_i)$ kann vollständig durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$S(t, \lambda_i) = \left(\sum_{k=1}^n SAS_k(\lambda_i)(U^{-1}\epsilon)_j U_{jk} \right) \cdot \sum_{j=1}^n \exp(\Lambda_{jj}t) \otimes IRF(t) \quad (2.17)$$

Hierbei steht $SAS_k(\lambda_i)$ für das Spektrum der k -ten Spezies, U für die Eigenvektormatrix der Transfermatrix T und die Diagonalmatrix Λ_{jj} für die effektiven Raten der jeweiligen Spezies ($\Lambda_{jj} = -1/\tau_j$). Auffällig ist, dass Gleichung 2.17 gewisse Ähnlichkeiten zu Gleichung 2.13 aus der *Global Lifetime Analysis* zeigt. Ein wichtiger Unterschied besteht jedoch darin, dass die Amplituden und Lebenszeiten der *Target Analysis* nicht mehr bloß mathematische Beschreibungen des Systems sind, sondern nun echte physikalische Parameter, wie zum Beispiel Übergangsraten verschiedener Prozesse oder Spektren, widerspiegeln. Ein wichtiger Parameter sind die *Species Associated Spectra* (SAS), welche die Reinspektren einer jeden Spezies darstellen. Die SAS stehen in direkter Relation zu den DAS, das DAS einer bestimmten Lebenszeit ist eine Linearkombination aus den SAS der partizipierenden Zustände.

$$DAS_j(\lambda_i) = \sum_{k=1}^n b_{jk} SAS_k(\lambda_i) \quad (2.18)$$

Hierbei ist bei gegebenem kinetischen Modell b_{jk} eine Koeffizientenmatrix, die von den Ratenkonstanten abhängt. Letztendlich gibt es, wie bei der *Global Lifetime Analysis*, auch hier nur einen Satz an Lebenszeiten, der die Kinetiken bei allen Detektions-Wellenlängen beschreibt und daher genutzt werden kann, um den Datensatz global zu fitten.

2.3 Retinalproteine

Retinalproteine, oder auch Rhodopsine genannt, können in allen Domänen des Lebens gefunden und in zwei verschiedene Gruppen klassifiziert werden. Tierische Rhodopsine (Typ II), welche ausschließlich photosensorische Rezeptoren sind [14] und in höheren Eukaryoten gefunden werden können und mikrobielle Rhodopsine (Typ I), die vielen verschiedenen Funktionen nachgehen, wie zum Beispiel als lichtgetriebene Ionenpumpen und -kanäle, photosensorische Rezeptoren oder auch als Photoschalter für die Genexpression.[15, 16] Obwohl die Sequenzen von Typ I und II Rhodopsinen sehr unterschiedlich sind, besitzen beide die gleiche grundlegende Struktur in Form von sieben transmembranen α -Helices.[17] Der Chromophor, das Retinal, ist über eine Schiffsche Base an die ϵ -Amino Gruppe eines Lysins in Helix 7 mit dem Opsin verbunden. Die Konformation des Retinals unterscheidet sich jedoch zwischen den tierischen und mikrobiellen Rhodopsinen. In tierischen Rhodopsinen liegt das Retinal in der 11-*cis* Konformation vor und isomerisiert nach Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge zum all-*trans* Retinal. Bei mikrobiellen Rhodopsinen ist der Ausgangszustand des Retinals die all-*trans* Konformation, welche nach Anregung zum 13-*cis* Retinal isomerisiert (Abbildung 2.2).

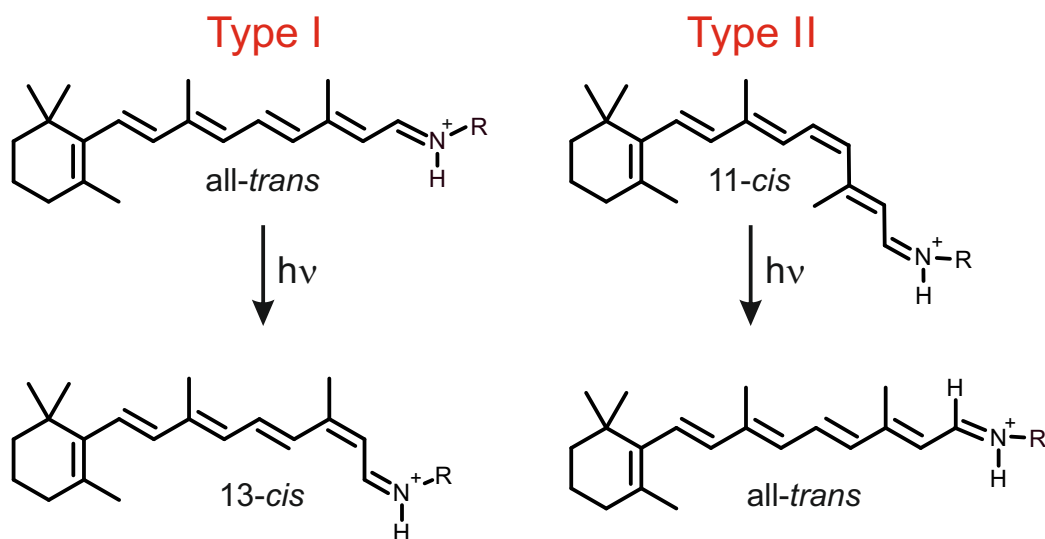


Abbildung 2.2: Isomerisierung von Typ I und Typ II Retinal.

Die ersten mikrobiellen Rhodopsine wurden in *Halobacterium salinarum* gefunden und deswegen Bacteriorhodopsin (BR) [18] und Halorhodopsin (HR) [19] genannt. Ersteres ist eine Protonenpumpe, welche Protonen von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Membran pumpt, letzteres pumpt Chlorid-Ionen in die entgegengesetzte Richtung. In *Halobacterium salinarum* wurden einige Jahre später noch zwei weitere Retinalproteine gefunden, welche als Sensoren für Licht verschiedener Wellenlängen fungieren und somit das Schwimmverhalten der Zelle beeinflussen (Phototaxis). [20] Aufgrund ihrer Funktion wurden diese beiden Proteine Sensory Rhodopsin I (SRI) und Sensory Rhodopsin II (SRII) genannt. Im gleichen Jahr wurde im Augenfleck der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ebenfalls ein Rhodopsin Photorezeptor gefunden [21], welches in den folgenden Jahren untersucht und charakterisiert wurde. [22–24] Da dieser Photorezeptor Eigenschaften eines selektiven Protonenkanals aufwies, wurde er Channelrhodopsin 1 (ChR1) genannt. [25] Später stellte sich heraus, dass ChR1 nicht nur Protonen, sondern auch Na^+ , K^+ und Ca^{2+} Ionen transportieren kann. [26] Aus dem gleichen Organismus wurde noch ein zweites Channelrhodopsin isoliert, Channelrhodopsin 2 (ChR2). Bei diesem konnte von Anfang an gezeigt werden, dass auch andere Kationen als Protonen transportiert werden können. [27] ChR1 und ChR2 weisen beide Sequenzübereinstimmungen mit BR und anderen Typ I Retinalproteinen auf, die hauptsächlich im Bereich der Retinal-Bindetasche und im Protonen-Transportweg liegen, was darauf hinweisen könnte, dass Channelrhodopsine den Ionen-Transport-Mechanismus zum Teil mit anderen mikrobiellen Rhodopsinen teilen könnten. [28]

Im Jahr 2000 wurde durch Genom-Analyse ein weiteres Retinalprotein in unkultivierten γ -Proteobakterien (SAR86) aus einer Wasserprobe in Monterey Bay in Kalifornien gefunden, welches eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit den zuvor gefundenen archaealen Rhodopsinen hatte. Dies war der erste Hinweis auf einen bakteriellen retinalbasierten Photorezeptor. Hierbei handelte es sich um Proteorhodopsin (PR), welches ähnlich zu BR auch eine lichtgetriebene auswärtsgerichtete Protonenpumpe ist. [29] Heutzutage wird davon ausgegangen, dass ca. 50% aller Mikroorganismen in der photischen Zone des Meeres PR-ähnliche Gene besitzen [30], aber auch in Organismen in Frischwasser, Bergen und in uralten sibirischen Permafrost Proben konnten PR-ähnliche Gene identifiziert werden. [31–

[34] Aufgrund der großen Diversität und der weiten Verbreitung von PR-ähnlichen Genen ist das Protein gut für verschiedene Bedingungen adaptierbar. So kann eine einzige Mutation an Stelle 105 von Leucin zu Glutamin die Absorption aus dem grünen Spektralbereich (525 nm) in den blauen Spektralbereich (490 nm) verschieben, um sich zum Beispiel den verschiedenen Tiefen im Meer und dem damit noch vorhandenen Lichtspektrum anzupassen. [35] Hierbei handelt es sich dann um GPR (green absorbing Proteorhodopsin) und BPR (blue absorbing Proteorhodopsin). Lange Zeit bestand die weit verbreitete Annahme, dass Na^+ und Kationen höherer Ordnung nicht von Retinalproteinen gepumpt werden können, da der Ionentransport durch die positive Ladung der protonierten Retinalschiffbase (RSB) blockiert wird. Dies änderte sich mit der Entdeckung des *Krokinobacter Eikastus* Rhodopsin 2 (KR2), welches als auswärtsgerichtete lichtgetriebene Na^+ Pumpe fungiert. [36] *Krokinobacter Eikastus* besitzt noch ein weiteres Rhodopsin Gen, KR1, welches ebenfalls eine auswärtsgetriebene Protonenpumpe wie PR ist und auch das DTE Motiv für Protonenakzeptor, - donor und Gegenion besitzt. KR2 hingegen besitzt das NDQ Motiv, welches spezifisch für Natrium-Pumpen (NaR) zu sein scheint, da kurz darauf weitere Rhodopsin-basierte Natrium-Pumpen mit dem gleichen Motiv entdeckt wurden. [37–40] Interessant ist, dass KR2 trotz des fehlenden DTD(E) Motivs, in Abwesenheit Kationen höherer Ordnung, trotzdem Protonen pumpen kann. [36] Der Mechanismus hierfür ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch ungeklärt. Die Entdeckung der Retinalproteine, und die Entdeckung von Channelrhodopsin im Speziellen wurde Basis für das Feld der Optogenetik. [41, 42] Die grundlegende Idee war ChR2 in Nervenzellen zu exprimieren, um diese anschließend durch Lichteinwirkung depolarisieren zu können. Verschiedene Forschungsgruppen begannen Channelrhodopsine, meist eine verkürzte ChR2 Version, in den Neurowissenschaften einzusetzen. In den Jahren 2005 - 2006 konnte die Anwendbarkeit in Neuronen des Hippocampus, Schnitten von Mäusegehirnen, PC12 Zellen, Rückgrat von lebenden Hühnerembryos, der Retina von blinden Mäusen und transgenen *C. elegans* gezeigt werden. [43–47] In der Optogenetik versucht man bestimmte lichtaktivierbare Proteine in Subpopulationen von bestimmten Nervenzellen zu exprimieren, um diese mit kurzen Lichtpulsen zu aktivieren (depolarisieren) oder zu deaktivieren (polarisieren). In Gehirnen von Säugetieren funktioniert dies sogar ohne die Zugabe von exogenem

Retinal, da genug endogene Retinale vorhanden sind. Die hauptsächlich genutzten Ionenkanäle können die Ionen jedoch nur entlang eines Gradienten transportieren, und sorgen meist für einen einwärts gerichteten Transport der Ionen und somit für eine Depolarisation der Zelle. HR kann benutzt werden, um der Depolarisation einer Zelle entgegenzuwirken, da es Chlorid-Ionen in die Zelle hinein pumpen kann. Abbildung 2.3 zeigt verschiedene Retinalproteine und ihr jeweiliges Transportverhalten, welches für die Optogenetik genutzt werden kann. Will man eine Hyperpolarisation in der Zelle induzieren, muss man Kationen aus der Zelle heraus transportieren. Große Hoffnung wird hier in KR2 und die anderen Natriumpumpen (NaR's) gesetzt, da diese die momentane Toolbox der optogenetisch anwendbaren Retinalproteine um einen wichtigen Baustein erweitern. Für KR2 konnte bereits gezeigt werden, dass sich dieses in Neuronen von Ratten und und in lebenden *C. elegans* exprimieren lässt. [48]

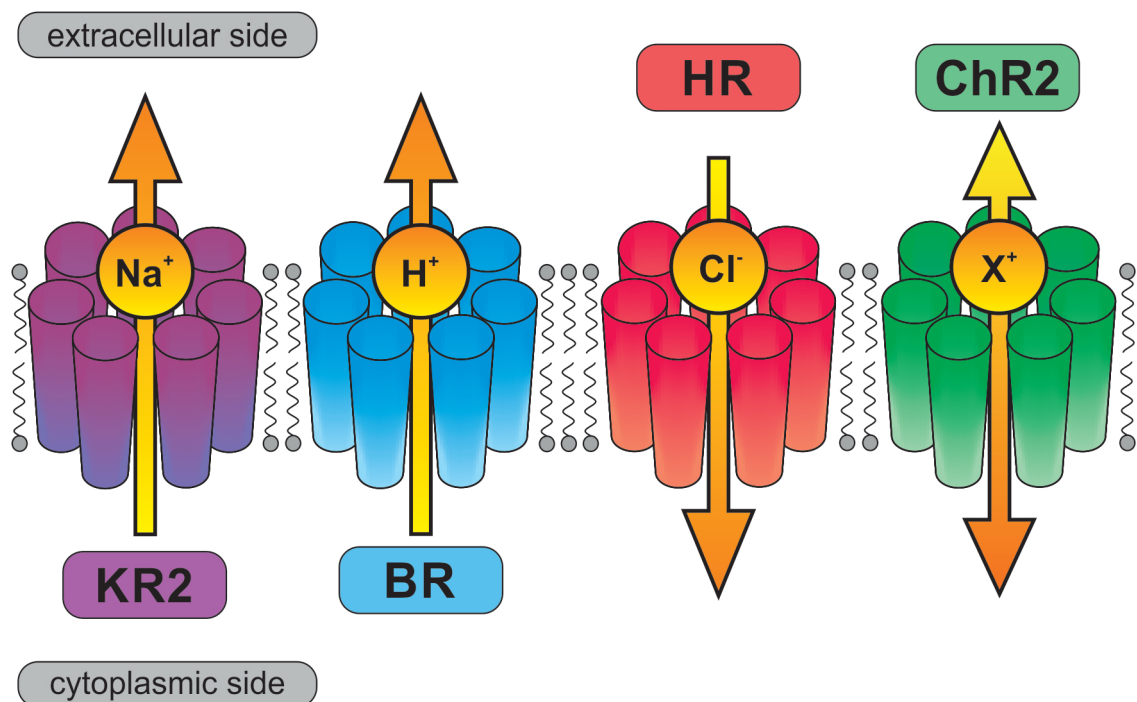


Abbildung 2.3: Verschiedene mikrobiellen Rhodopsine, von links: KR2 als auswärts Natrium-Pumpe, BR als auswärts Protonen-Pumpe, HR als einwärts Chlorid-Pumpe und ChR2 als Kationen-Kanal.

Teil II

Experimentelle Methoden

Kapitel 3

Anlagen und Programme

3.1 Blitzlichtphotolyse

Die Blitzlichtphotolyse ist eine Anreg-Abtast-Spektroskopie Technik, mit deren Hilfe man schnelle photochemische Kinetiken untersuchen kann. Sie wurde 1949 von M. Eigen, R. George, W. Norrish und G. Porter entwickelt [49]. Für die Entwicklung der Technik bekamen sie 1967 den Nobelpreis in Chemie. Bei der Blitzlichtphotolyse wird eine Probe mit Hilfe eines kurzen Lichtblitzes, z.B. von einem Nanosekundenlaser, angeregt und nach einer Verzögerungszeit x durch einen Abtastpuls die Absorption und damit auch die Absorptionsänderung zum Grundzustand gemessen. Das Abtasten kann gepulst durch eine Blitzlampe erfolgen womit man zu einer bestimmten Verzögerungszeit ein ganzes Spektrum erhält (Breitband Blitzlichtphotolyse). Alternative kann auch mit einer monochromatischen Dauerlichtquelle abgetastet werden, hierbei nimmt man die Absorptionsänderung als Funktion der Zeit für eine bestimmte Wellenlänge auf.

3.1.1 Laser Pump-Lichtquelle

Als Pumplaserquelle für die Blitzlichtphotolyse Anlagen wird ein Nd:YAG Laser (Spitlight 600, Innolas Laser GmbH, Deutschland) genutzt. Nd:YAG Laser sind Festkörperlaser mit einer 1-3% Nd^{3+} Dotierung des $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (Yttrium Aluminium Garnet, dt. Yttrium Aluminium Granat) Laserwirtmaterials. Für dieses eignen sich YAG Gitter besonders, da sie viele günstige Eigenschaften mit sich führen, sie

sind stabil, optisch isotrop und können mit trivalenten Ionen der Seltenen Erden und Eisen Gruppe dotiert werden. [50] Die optischen Eigenschaften des Lasermaterials werden durch die 4f-Elektronen der Nd^{3+} Ionen festgelegt. Eine Charakterisierung der Energielevel des Nd:YAG Lasers wurde von Königstein *et al.* durchgeführt. [51] Das Lasermaterial wird normalerweise von einer Blitzlampe mit 808 nm gepumpt. Nach Anregung in das ${}^4\text{F}_{5/2}$ Level wird innerhalb von Nanosekunden durch Relaxationsprozesse das ${}^4\text{F}_{3/2}$ Level besetzt. Die Lebenszeit dieses Laserlevels beträgt 240 μs und ist zu 99% durch Fluoreszenz bestimmt. Ist mehr als 6% des YAG Materials Nd^{3+} dotiert, so kann man eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer beobachten. Der stärkste Laserübergang ist der Übergang von ${}^4\text{F}_{3/2}$ nach ${}^4\text{I}_{11/2}$, welcher eine Wellenlänge von 1064 nm bei Raumtemperatur besitzt. Da Übergänge auch auf anderen, längeren oder kürzeren Frequenzen (946 nm, 1123 nm, 1319 nm), möglich sind muss die 1064 nm Frequenz bereits im Resonator gefiltert werden. Die somit erhaltene Laserfundamentale mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1064 \text{ nm}$ kann anschließend frequenzverdoppelt (532 nm) und -verdreifacht (355 nm) werden kann. Die Frequenzverdreifachte wird benutzt um einen optisch parametrischen Oszillator (OPO, optical parametric oscillator) zu betreiben. Der OPO besteht aus einen nichtlinearen Beta Barium Borat (BBO) Kristall in einem optischen Resonator. In diesem Kristall finden nichtlineare Prozesse zwischen den drei Photonen, dem *Pump*, *Signal* und *Idler* statt. Durch Variation des Kristallwinkels können verschiedene Wellenlängen für *Signal* und *Idler* erreicht werden. Der in dieser Anlage eingesetzte OPO (preciScan, GWU-Lasertechnik) ist dadurch von 412 - 2550 nm durchstimmbare. Benötigt man eine Anregung die weiter im ultravioletten (UV) Spektralbereich liegt muss eine anschließende Frequenzverdopplung (SHG, *second harmonic generation*) durchgeführt werden (uvScan, GWU-Lasertechnik, Deutschland). Abhängig von der zu erreichenden Wellenlänge sind hier zwei verschiedene BBO Kristalle verbaut, der UV2 Kristall ist durchstimmbare von 257 - 354 nm und der UV3 Kristall ist durchstimmbare von 355 - 514 nm.

3.1.2 Breitband-Blitzlichtphotolyse

Die Breitband-Blitzlichtphotolyse wurde im Zuge meiner Masterarbeit aufgebaut. [52] Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden entscheidende Verbesserungen sowie eine Automatisierung des Messverfahrens implementiert, im Folgenden soll das aktuelle Experiment beschrieben werden.

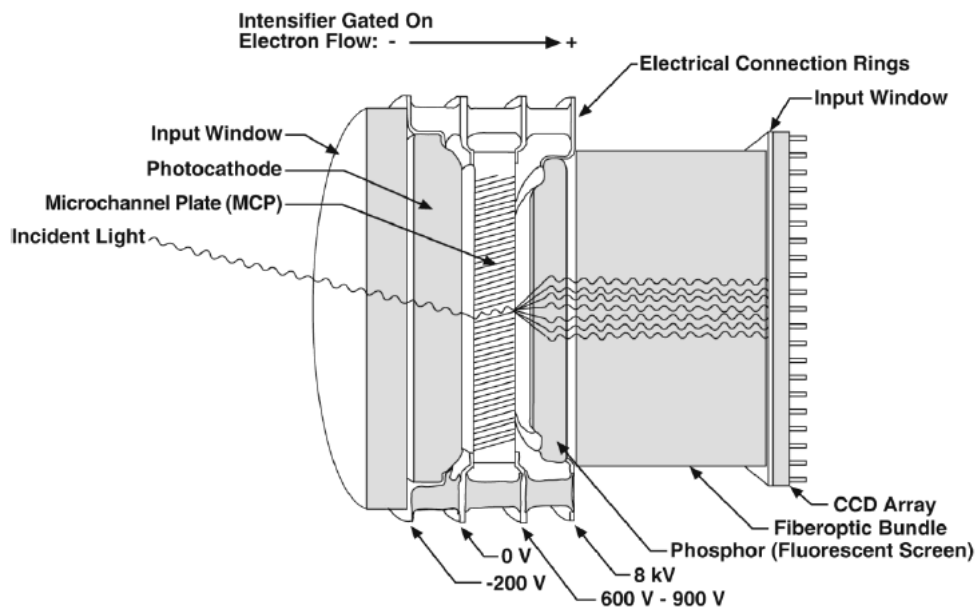


Abbildung 3.1: Aufbau einer ICCD Kamera. [53]

Der Abtast Lichtblitz wird von einer 60 W Xenon Blitzlampe (Hamamatsu L7685) erzeugt. Das generierte Weißlicht reicht spektral von 190 - 2000 nm. Der Puls hat eine Halbwertszeit von $2,9 \mu\text{s}$ und eine Energie von 1 J pro Blitz.

Die Detektion wird von einer *intensified charge-coupled device* (ICCD) Kamera (PI-MAX 3, Princeton Instruments) durchgeführt. Eine ICCD Kamera ist eine CCD Kamera, die über ein Glasfaserkabel optisch an einen Bildverstärker gekoppelt ist. Der Verstärker besteht aus drei Hauptkomponenten, einer Photokathode, einer Mikrokanalplatte und einem Phosphorschirm (Abbildung 3.1). Aufgrund des Verstärkers kann nicht der gesamte Sensor der Kamera ausgeleuchtet werden, weshalb zwei *Regions of Interest* (ROI) auf dem Sensor gewählt wurden, die das jeweilige Proben- und Referenzlicht aufzeichnen. Diese ROIs haben jeweils eine Höhe von 34 Pixel, über welche gemittelt wird, und eine Länge von 643 Pixeln. Damit kann ein Bereich

3.1. BLITZLICHTPHOTOLYSE

von ca. 320 nm, je nach Gitter, auf einmal detektiert werden. Hieraus folgt eine spektrale Auflösung von ungefähr 0,5 nm pro Pixel. Vor der Kamera befindet sich ein Spektrograph, welcher mit zwei verschiedenen optischen Gittern bestückt ist. Ein Gitter besitzt einen Blazewinkel optimiert für 300 nm, während das andere Gitter für den Bereich um 500 nm optimiert ist.

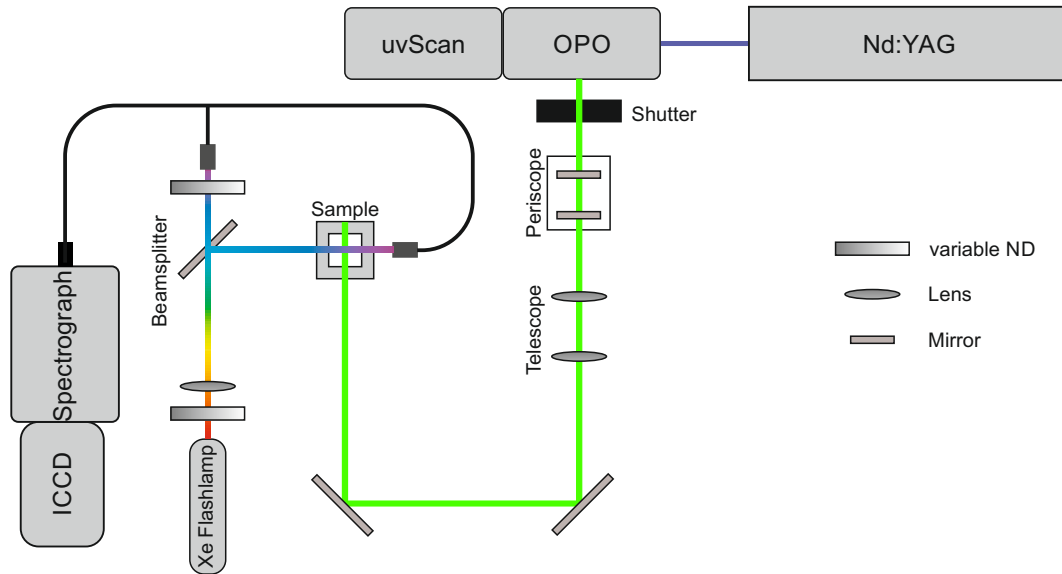


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der Breitband Blitzlichtphotolyse.

Je nach Detektionsbereich muss hier also das richtige Gitter für den Spektralbereich gewählt werden. Die Gitter können mithilfe des Programms WinSpec, welches die Kamera und den Spektrographen steuert, getauscht und verfahren werden. Hierbei muss nur das Gitter sowie die gewünschte Zentralwellenlänge gewählt werden, das Gitter wird dann anhand einer Kalibrationstabelle, welche die Winkel mit den dazugehörigen Wellenlänge verknüpft automatisch in die richtige Position gefahren. Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung der Anlage. Das Anregungslicht, welches den OPO verlässt, passiert zuerst einen Shutter. Dieser ist für die richtige Taktung des Anrempulses verantwortlich, da der YAG Laser konstant mit 10 Hz betrieben wird. Der Shutter öffnet sich 50 ms vor dem erwarteten Laserpuls, bleibt 100 ms lang offen und schließt sich dann wieder. Dies garantiert, dass nur ein Puls in der Zwischenzeit den Shutter passieren kann. Nach dem Shutter gelangt der Anrempuls in ein Periskop, welches den Strahl auf die gewünschte Höhe von 14,5 cm bringt. Mit dem anschließenden Teleskop kann der Durchmesser des Laserstrahls eingestellt

werden. Dieser richtet sich hauptsächlich nach der Füllhöhe der Probe in der Küvette, da das gesamte Probenvolumen angeregt werden muss, um Diffusionseffekte, welche auf den für die Blitzlichtphotolyse üblichen Zeitskalen eine Rolle spielen können, zu vermeiden. Über zwei weitere Spiegel gelangt der Anregpuls schließlich zum Küvettenhalter in welchem sich die Probe befindet. Der Halter ist austauschbar und kann z.B. durch einen temperierbaren Probenhalter ersetzt werden. Das restliche Anregungslicht, welches nicht von der Probe absorbiert wird, wird anschließend von einem Metallblock geblockt. Das Abtastlicht wird von einer Xe Blitzlampe erzeugt und über eine Faser ausgekoppelt. Das Weißlicht passiert zuerst einen variablen Neutralsdichtefilter, der für die Intensitätsanpassung zuständig ist. Dies ist notwendig um eine Sättigung der Kamera zu vermeiden. Anschließend wird das divergierende Weißlicht durch eine Sammellinse kollimiert und vom anschließenden Strahlteiler in einen Proben- und einen Referenzstrahl aufgeteilt. Der Probenstrahl wird durch die Probe geleitet und wird von einer Faser, welche zum Spektrograph geführt wird, aufgenommen. Das Referenzlicht kann durch einen weiteren variablen Neutralsdichtefilter in der Intensität dem Probenlicht angepasst werden und wird dann ebenfalls von einer Faser die zum Spektrograph führt aufgenommen. Die beiden Fasern laufen übereinander, so dass das Detektionslicht am Ende räumlich getrennt übereinander auf dem CCD Sensor abgebildet werden kann. Die von der Kamera detektierten Daten werden vom Programm WinSpec aufgezeichnet. Genaueres hierzu ist in Unterabschnitt 3.1.4 beschrieben. Die Zeitgebung wird von einem Pulsverzögerungsgenerator (*Pulse Delay Generator*) (9200 Sapphire Digital Delay Pulse Generator; Quantum Composers, Bozeman, MT) gesteuert. Dieser steuert das Auslösen der Blitzlampe, das Aufnehmen der Kamera und den Shutter, welcher einzelne Anregungspulse des frei laufenden Lasers auskoppeln kann, in Abhängigkeit des Pockelszellensignals des Lasers. Das hierzu gehörige Programm wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Daniel Göttner in LabView programmiert. [54]

Das generelle Messprinzip basiert darauf immer ein ganzes Spektrum zu einem definierten Zeitpunkt aufzunehmen. Die Zeitpunkte werden über eine elektronische Verzögerung variiert. Für jeden Zeitpunkt wird jeweils Probe und Referenz gleichzeitig aufgenommen, sowie einmal mit und einmal ohne Anregung nacheinander. Aus diesen vier Signalen wird das Absorptionsdifferenzsignal zu einem bestimmten

Zeitpunkt berechnet. Dies wiederholt sich anschließend zu einem späteren Verzögerungszeitpunkt. Wurden alle Daten zu den gewählten Verzögerungszeiten aufgenommen, so beginnt die Aufzeichnung wieder von vorne, bis die gewünschte Anzahl an Durchläufen erreicht ist.

3.1.3 Transiente Blitzlichtphotolyse

Im Gegensatz zur Breitband-Blitzlichtphotolyse ist das Messprinzip bei der transienten Blitzlichtphotolyse ein gänzlich anderes. Hier wird nicht ein ganzes Spektrum zu verschiedenen Zeiten aufgenommen, sondern ein monochromatisches Signal über die Zeit aufgenommen. Das Resultat ist der zeitliche Verlauf des Signals bei einer einzelnen Wellenlänge.

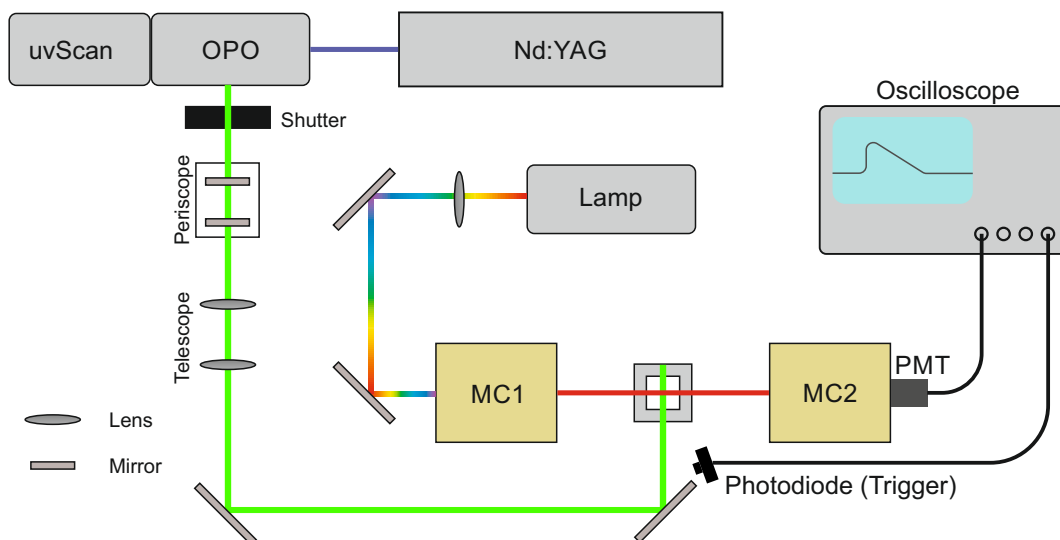


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau der transienten Blitzlichtphotolyse.

Das Abtast-Licht wird von einer Quecksilber-Xenon Lampe (LIGHTNINGCURE LC8, Hamamatsu, Japan) erzeugt. Das hier generierte Weißlicht wird durch einen Monochromator (Photon Technologies International) geleitet, welcher das Licht aufspaltet und nur das gewünschte monochromatische Licht transmittiert. Der Monochromator kann per Hand auf 0,5 nm genau eingestellt werden. Nach dem Monochromator passiert das Licht die Probe, um anschließend durch einen zweiten Monochromator zu einer Photonenvervielfacherröhre (*Photomultiplier Tube*, PMT) geleitet zu werden. Der zweite Monochromator dient hauptsächlich dem Zweck unerwünschtes

Streulicht z.B. von der Anregung zu blocken. Die PMT detektiert das transiente Signal, welches von einem digitalen Speicheroszilloskop (DPO 5204B, Tektronix) aufgezeichnet wird. Getriggert wird die Aufnahme über eine Photodiode (DET10A/M, Thorlabs), welche das Anregungslicht detektiert und damit die Messung startet. Eine schematische Darstellung der Anlage ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Die Anregungslichtquelle, sowie deren Strecke ist weitgehend gleich mit der, die bereits in Unterabschnitt 3.1.2 beschrieben wurde. Auch hier wird das Triggern des Shutters für die Anregung von dem Pulsverzögerungsgenerator gesteuert. Im Gegensatz zur Breitband-Blitzlichtphotolyse ist hier jedoch kein selbst geschriebenes Programm für dessen Steuerung nötig, sondern reicht das Standardprogramm von Quantum Composers für die Steuerung in diesem Fall aus. Es wird auch nur der Shutter für das Anregungslicht getriggert, da das Oszilloskop direkt über die Photodiode sein Startsignal erhält.

3.1.4 Datenaufzeichnung & -verarbeitung

Für die in Unterabschnitt 3.1.2 und Unterabschnitt 3.1.3 beschriebenen Anlagen mussten jeweils verschiedene Programme für die Datenaufzeichnung und -verarbeitung programmiert werden. Im Wesentlichen wurden drei verschiedene Programme erstellt. Dabei handelt es sich um ein Programm zur Datenverarbeitung der Breitband-Blitzlichtphotolyse, eines für dessen Signalgebung und eines zur Datenreduktion der transienten Blitzlichtphotolyse. Zuerst soll hier das Signalgebungsprogramm für die Breitband-Blitzlichtphotolyse besprochen werden.

Blitzlichtphotolyse - Pulsverzögerung

Das Programm *Blitzlichtphotolyse - Pulsverzögerung* (BP-PV) wurde zusammen mit Daniel Göttner während seiner Bachelor Arbeit erstellt. [54] Es handelt sich im Wesentlichen um die Steuerung des Pulsverzögerungsgenerator 9200 Sapphire von Quantum Composers. Das Programm wurde in LabView 2015 programmiert. Vor der Erstellung dieses Programms mussten die zu messenden Zeitpunkte für Kamera-Integrationszeiten von $<10 \mu\text{s}$, aus technischen Gründen, alle einzeln per Hand im Programm WinSpec eingegeben werden. Erst für Integrationszeiten $>10 \mu\text{s}$ konnten einzelne Dekaden automatisiert gemessen werden. Ziel des Programms war die vollautomatische Messung des gesamten Zeitbereichs. Hierfür muss zuerst ein Zeitstrahl, welcher aus einem linearen und einem exponentiellen Vektor besteht, generiert werden. Die Parameter des linearen Vektors sind Start sowie Ende in μs , sowie die Anzahl der Schritte. Berechnet werden die Vektorelemente $v_{i,lin}$ des linearen Vektors \vec{v}_{lin} wie in Gleichung 3.1 und die Vektorelemente $v_{i,exp}$ des exponentiellen Vektors \vec{v}_{exp} wie in Gleichung 3.2 gezeigt. Hierbei sind n und m die jeweilige Anzahl der linearen beziehungsweise exponentiellen Schritte.

$$v_{i,lin} = v_{0,lin} + i_{lin} \cdot \frac{v_{n,lin} - v_{0,lin}}{n_{lin}} \quad (3.1)$$

$$v_{i,exp} = 10^{\lg(v_{0,exp}) + i_{exp} \cdot \frac{\lg(v_{m,exp}) - \lg(v_{0,exp})}{m_{exp}}} \quad (3.2)$$

Es besteht auch die Möglichkeit den Zeitvektor nicht komplett durchzufahren, sondern in zwei Teile zu teilen. Hierbei ist der Zeitpunkt des Umbruchs frei wählbar, geht jedoch meistens mit der Integrationszeit einher. Das Aufteilen der Messung in zwei verschiedene Bereiche kann sinnvoll sein, wenn man zum Beispiel die Integrationszeit variieren will, um für die späteren Zeitpunkte ein besseres Signal zu Rausch Verhältnis zu bekommen. Die graphische Oberfläche des Programms ist in Abbildung 3.4 abgebildet.

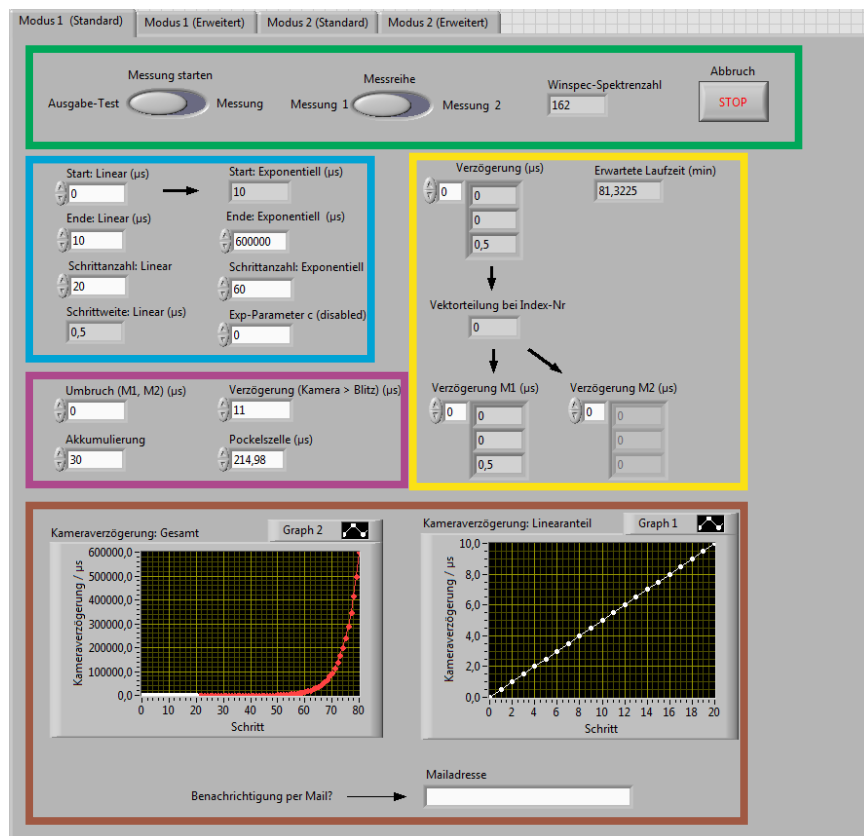


Abbildung 3.4: Graphische Oberfläche des Blitzlichtphotolyse Pulsverzögerungsprogramms. Schaltflächen im grünen Kasten sind zum Starten und Beenden der Messung, Eingabefelder im blauen und roten Kasten sind für die Parameter des linearen und exponentiellen Zeitvektors zuständig. Die Werte im gelben Kasten zeigen den Zeitvektor und dessen Aufspaltung, sowie die erwartete und berechnete Messdauer des Experiments an. Die Graphen im braunen Kasten zeigen den Zeitvektor gesamt, sowie den linearen Teil an. Der lilane Kasten beinhaltet weitere setup- und messspezifische Einstellungen.

3.1. BLITZLICHTPHOTOLYSE

Die Einstellungen für den linearen Zeitvektor sind im blauen Kasten, sowie die Einstellungen des exponentiellen Zeitvektors im roten Kasten zu finden. Weitere Einstellungen sind im lila Kasten untergebracht. Hier kann die Anzahl der Akkumulationen, wie oft die komplette Messung wiederholt werden soll, festgelegt werden. Der Umbruch ist für eine Unterbrechung der Messung zuständig, falls die Messung in mehrere Teile aufgeteilt werden soll. Die letzten beiden Parameter in diesem Kasten sind anlagenspezifisch. Die Verzögerung gibt an, wie viele μs der Trigger für das Blitzlicht vor dem Trigger für die Kamera ausgelöst werden soll. Die Blitzlichtlampe muss vor der Kamera getriggert werden, da die Lampe eine gewisse Auflade- und Auslösezeit benötigt. Außerdem kann hiermit gesteuert werden wie Kamera-Integrationszeit und Blitzlichtpuls sich überlagern. Der hier eingetragene Wert von $11 \mu\text{s}$ ist empirisch bestimmt. Zuletzt gibt es noch die Option der Pockelszelle, dieser Wert wird aus dem Lasersteuerungsprogramm abgelesen und hier eingetragen (*Delay 0*).

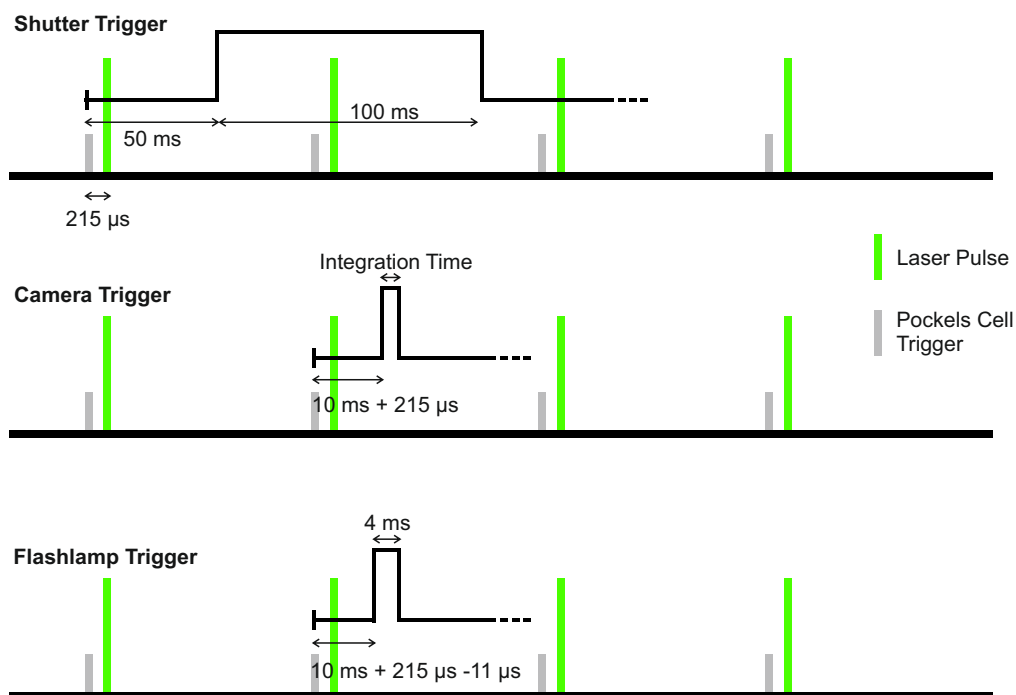


Abbildung 3.5: Puls Schema für das Triggern der verschiedenen Geräte, die für die Blitzlichtphotoyse benötigt werden. Angesteuert werden der Shutter, welche die benötigten Pulse aus den 10 Hz Pulsen des Lasers auskoppelt, die Kamera, welche das Weißlicht aufzeichnet und die Blitzlampe, die das zu detektierende Weißlicht erzeugt.

Der Wert kann am Laser variiert werden, um den Laseroutput zu erhöhen oder zu verringern. Er gibt die Zeit an, welche zwischen dem Triggersignal der Pockelszelle und dem Auskoppeln des Laserpulses vergeht, und muss als fester Wert zu allen Verzögerungszeiten addiert werden, um diese Verzögerung zu kompensieren. Abbildung 3.5 veranschaulicht die Pulsgebung der verschiedenen Prozesse. Hierbei ist in grau der Trigger der Pockelszelle (PZ) und in hellgrün der Laserpuls in einem zeitlichen Verlauf dargestellt. Der Laserpuls ist um den oben erwähnten *Delay 0* zum PZ Trigger verzögert, in diesem Beispiel handelt es sich um $215\ \mu\text{s}$, welches der maximalen Laserintensität entspricht. Der Shutter-Trigger wird vom ersten PZ Signal getriggert, wartet $50\ \text{ms}$ und wird dann $100\ \text{ms}$ auf High geschaltet (Iris öffnet sich). Dies soll garantieren, dass der Shutter auf jeden Fall zum Zeitpunkt des Laserpulses geöffnet ist. Wichtig hierbei ist, dass das Öffnen des Shutters schon vom vorhergehenden PZ Trigger ausgelöst wird und nicht erst von dem zum Laserpuls gehörenden PZ Trigger. Der Kamera Trigger wird von dem darauffolgenden PZ Trigger aufgelöst. Hier beträgt die Wartezeit $215\ \mu\text{s}$ (*Delay 0*) plus die Verzögerungszeit, zu der gemessen werden soll. In diesem Beispiel sind es $10\ \text{ms}$. Dies bedeutet, dass ein Absorptionsspektrum $10\ \text{ms}$ nach dem Anregungsereignis aufgenommen wird. Nach der Wartezeit wird das Signal für die Dauer der Integrationszeit auf High gestellt, so lange das Signal High ist, nimmt die Kamera auf. Der Trigger der Blitzlampe ist ähnlich zu dem der Kamera, nur hier müssen von der Wartezeit weitere $11\ \mu\text{s}$ abgezogen werden, um die Auflade und Auslösezeit der Kamera zu kompensieren. Das Signal wird für $4\ \text{ms}$ auf High geschaltet, da diese Zeit notwendig für das Auslösen der Blitzlampe ist.

Generell wird jede Verzögerungszeit zweifach gemessen, einmal mit Laser Anregung und einmal ohne (geschlossener Shutter). Dies ist notwendig für die spätere Berechnung des Absorptionsdifferenzsignals, so hat man zu jeder Verzögerungszeit die passenden I und I_0 Werte. Die vom Programm WinSpec aufgenommenen Werte werden anschließend im Programm *ICCD Combine* verrechnet und in einen Datensatz mit Wellenlänge sowie Zeit konvertiert. Dies ist notwendig, da das Triggering extern geschieht und das Aufnahmeprogramm keine Informationen darüber hat, welche Verzögerungszeiten gemessen wurden.

ICCD Combine

Damit die aufgenommenen Blitzlichtphotolyse-Daten nach Beendigung der Messung angezeigt und ausgewertet werden können, müssen diese zunächst zusammengefügt und in ein einheitliches Datenformat gebracht werden. Da die Aufnahme der Spektren von einem anderen Programm übernommen wird, als die Verarbeitung der Verzögerungszeiten, müssen diese separat zusammengefügt werden. Durch das Benutzen der ROIs kann es auch im Programm WinSpec zu Fehlern bei den gespeicherten Wellenlängen für die jeweilige Messung kommen, daher werden auch diese nochmals unabhängig als extra Datensatz hinzugefügt. Der Fehler in den Wellenlänge liegt daran, dass das Programm WinSpec in manchen Situationen die ROI vernachlässigt und zwar die richtige Anzahl an Wellenlängen speichert, jedoch nicht ab Pixel 201, wie in den ROIs definiert, sondern ab Pixel 1, was zu einer Verschiebung des ganzen Spektrums um ca. 100 nm führt. Um dies zu umgehen wurde für typische Zentralwellenlängen jeweils ein Spektrum mit den korrekten Wellenlängen gespeichert, welches später im Programm geladen werden kann. Existiert diese Datei für die gewünschte Zentralwellenlänge nicht, muss wie folgt vorgegangen werden: Zuerst wird der Spektrograph auf das richtige Grating, sowie die richtige Zentralwellenlänge gestellt.

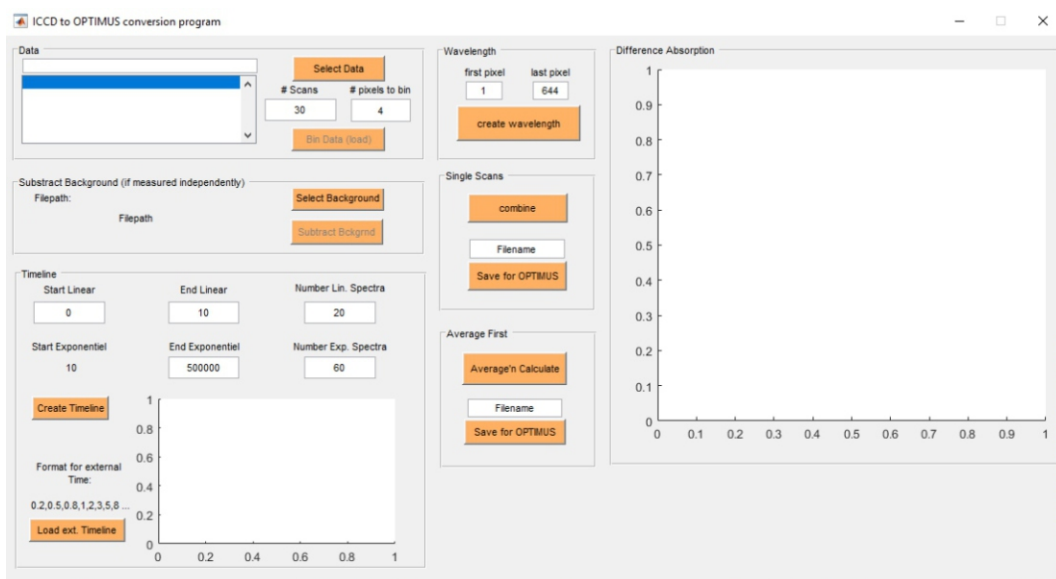


Abbildung 3.6: Graphische Oberfläche des ICCD Combine Programms.

Nach dem Verfahren des Spektrographen nimmt man ein einzelnes Spektrum auf, ob dieses belichtet wird oder nicht ist in diesem Fall irrelevant. Das erste Spektrum, bzw. die erste Messung nach Verfahren des Spektrographen wird immer mit der passenden Wellenlänge von WinSpec gespeichert. Diese Messung wird gespeichert, um sie später dann in das ICCD Combine Programm zu laden, um die spätere Probenmessung mit der richtigen Wellenlänge zu versehen. Abbildung 3.6 zeigt die graphische Oberfläche des Programms `ICCD Combine`, es besteht aus 5 Sektionen, welche nacheinander ausgeführt werden sollten. Zuerst muss der aufgenommene Datensatz über die Schaltfläche `Select Data` eingeladen werden. Im Normalfall besteht dieser aus einer mittels WinSpec generierten und in ASCII konvertierten *.txt Datei. Wurde die Messung aufgrund von Breakpoints oder Ähnlichem jedoch in mehrere verschiedene Dateien aufgeteilt, so können hier auch mehrere Dateien gleichzeitig eingeladen werden. Wichtig hierbei ist die richtige Reihenfolge, angefangen von den frühesten bis zu den späteren Zeiten. Ob die Dateien in der richtigen Reihenfolge sind, lässt sich nach dem Laden in der angezeigten Liste kontrollieren. Ebenfalls im Data Tab muss angegeben werden, wie viele Scans für die jeweilige Messung gemacht wurden und ob eine bestimmte Anzahl an Pixeln zusammengesetzt werden soll, um ein besseres Signal zu Rausch Verhältnis zu erreichen. Die Standardeinstellung hierfür sind vier Pixel, welches in einer spektralen Auflösung von ca. 2 nm resultiert. Die hier eingestellte Zusammenlegung der Pixel wird automatisch für die Hintergrundmessung übernommen. Sind alle Einstellungen getätigt, werden die Daten mit der Schaltfläche `Bin Data (load)` geladen. Nach Betätigen der jeweiligen Schaltfläche ändert sich deren Farbe von orange nach grün, damit der Benutzer weiß, welche Operationen bereits durchgeführt wurden. Das Abziehen des Dunkelspektrums der Kamera kann entweder direkt in WinSpec, oder im `ICCD Combine` Programm durchgeführt werden. Wird das Dunkelspektrum separat abgezogen, so wird hierfür der Tab `Substract Background` genutzt. Hier kann das Hintergrundspektrum eingeladen und anschließend abgezogen werden. Da die Zeitgebung der Blitzlichtphotolyse von dem externen Programm `Blitzlichtphotolyse - Pulsverzögerung` übernommen wird, müssen hier auch die Informationen zu den Verzögerungszeiten eingegeben werden, dies geschieht im Tab `Timeline`. Das Datenformat ist identisch zu dem des Pulsverzögerungsprogramms welches bereits in

Abschnitt 3.1.4 mit Gleichung 3.1 und Gleichung 3.2 beschrieben wurde. Hier müssen der Start- und Endwert, sowie die Anzahl der Spektren im linearen Teil und der Endwert und die Anzahl der Spektren im exponentiellen Teil angegeben werden. Die Zeiten werden jeweils in Mikrosekunden angegeben. Alternativ, um eventuelle Fehler zu vermeiden, kann man auch eine extern gespeicherte Zeitlinie, z.B. exportiert aus dem Pulsverzögerungsprogramm, über die Schaltfläche `Load ext. Timeline` einladen. Um die korrekte Wellenlänge zu erhalten, muss die bereits erwähnte Wellenlängendatei eingeladen werden. Hierfür ist der Tab `Wavelength` zuständig. Hier kann eingegeben werden, welcher Pixelbereich aus dem Spektrum extrahiert werden soll. Im Normalfall werden die ersten 644 Pixel genommen, was genau der bereits ausgeschnittenen ROI entspricht. Hat man das Referenzspektrum jedoch über den kompletten Sensor angenommen, so muss hier als Anfangspixel 201 und als Endpixel 844 gewählt werden. Dies entspricht der ROI auf dem ganzen Sensor. Falls die ROIs für Spezialanwendungen angepasst werden sollten, so müssen hier natürlich auch entsprechend andere Pixel gewählt werden. Zuletzt müssen die Daten zusammengesetzt, mit Zeit und Wellenlänge versehen und die Absorptionsdifferenzen berechnet werden. Hierfür gibt es zwei verschiedene Methoden. Zuerst können die einzelnen Scans berechnet werden, welche dann anschließend im Programm OPTIMUS [10] gemittelt werden können. Vorteil dieser Methode ist, dass man die einzelnen Scans betrachten und eventuelle Ausreißer korrigieren, beziehungsweise ganze Scans entfernen kann. Nachteile entstehen durch den extra Schritt der Mittelung in OPTIMUS, da hier keine Statistik für Blitzlichtphotolysedaten betrieben werden kann. OPTIMUS berechnet nur die Fehlervorpflanzung der bereits vorhandenen Fehler. Dafür müssen jedoch die Einzelpunkte statistische Fehler aufweisen, wie es unter Anderem in den Ultrakurzzeitmessungen der Fall ist. In der Blitzlichtphotolyse Messung hat man pro Messpunkt nur eine einzige Messung, welches die Angabe eines statistischen Fehlers unmöglich macht. Für das Speichern der Einzelscans wird analog zu den Ultrakurzzeitanlagen für jeden Scan eine separate *.dat Datei im Unterordner `scanfiles` angelegt, sowie eine übergeordnete *.scans Datei, welche die Pfade zu den einzelnen Scans enthält. Die zweite Option ist die Mittelung der Scans direkt im Programm. Dies resultiert in einer fertigen *.ana Datei, welche direkt in OPTIMUS für die weitere Analyse genutzt werden kann. Zusätzlich werden noch die Fehler aus der

Mittelung sowie deren Fehlerfortpflanzung für die Berechnung des Differenzsignals berechnet und in einer Nstat-Datei gespeichert. Diese kann zusätzlich in OPTIMUS eingeladen werden, um eine fehlerabhängige Analyse der Daten zu betreiben. Die Berechnung der Differenzspektren funktioniert in beiden Fällen (Einzelscans und direkte Mittelung) gleich. Für jeden Datenpunkt des Differenzspektrums werden vier verschiedene Messpunkte aufgenommen und verrechnet. Diese bestehen aus dem Signal der angeregten Probe $I_{probe}^*(\lambda, t)$ und dem der Referenz $I_{ref}^*(\lambda, t)$, sowie dem Signal der unangeregten Probe $I_{probe}(\lambda)$ und dem Referenz $I_{ref}(\lambda)$. Das Differenzsignal wird über folgende Formel berechnet:

$$\Delta Abs(\lambda, t) = -\log_{10} \left(\frac{I_{probe}^*(\lambda, t) \cdot I_{ref}(\lambda)}{I_{probe}(\lambda) \cdot I_{ref}^*(\lambda, t)} \right) \quad (3.3)$$

Datenreduktionsprogramm

Das Datenreduktionsprogramm wurde für die transiente Blitzlichtphotolyse geschrieben, um die aufgenommenen Daten zu verkleinern und somit auswertbar zu machen. Das Programm wurde für das Dateiformat des Tektronix DPO 5204B geschrieben, kann jedoch auch leicht an andere Speicheroszilloskope angepasst werden. Abhängig von der Abtastrate, mit der die Transienten aufgenommen werden, kann eine einzelne Transiente bis zu 8 GB Speicherplatz einnehmen. Da diese Datenmengen unhandlich sind, bzw. extrem rechenintensiv in der Auswertung sind, muss die Datenmenge reduziert werden, indem Datenpunkte der Transiente gemittelt werden. Dies verbessert auch das Signal zu Rausch Verhältnis immens, sodass man relativ rauschfreie Transienten erhält. Generell übernimmt das Datenreduktionsprogramm drei verschiedene Aufgaben gleichzeitig, erstens die Reduzierung der Datenmenge und die damit einhergehende Verbesserung des Signal zu Rausch Verhältnisses, zweitens die Konvertierung auf eine logarithmische Zeitskala und drittens die Berechnung des Differenzsignals. Abbildung 3.7 zeigt die graphische Oberfläche des Programms.

3.1. BLITZLICHTPHOTOLYSE

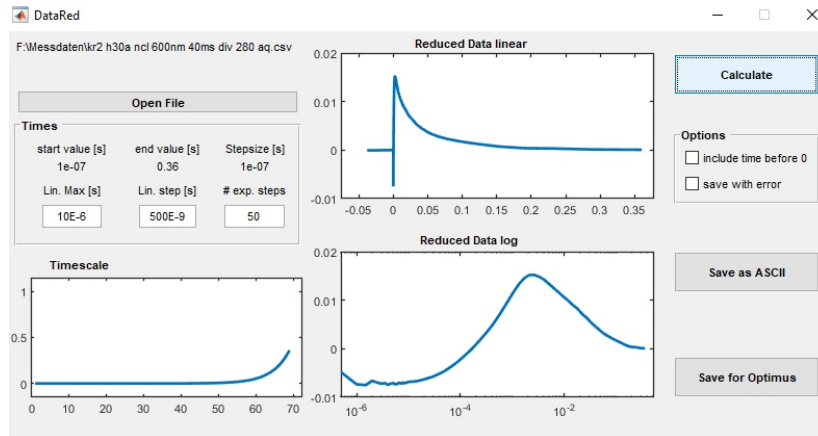


Abbildung 3.7: Graphische Oberfläche des Datenreduktionsprogramms für die transiente Blitzlichtphotolyse.

Zuerst muss über die Schaltfläche **Open File** ein Datensatz eingeladen werden. Je nach Größe des Datensatzes kann dies bis zu einigen Minuten dauern. Während des Importvorgangs wird ein Dialogfenster gezeigt, welches anzeigt, dass der Importvorgang noch im Gange ist. Wurden die Daten korrekt geladen, werden anschließend in den Textfeldern **start value**, **end value** und **stepsize** die jeweiligen Start- und Endwerte der Messung sowie der zeitliche Abstand zwischen zwei Messpunkten in Sekunden angezeigt. Anschließend kann man eine neue Zeitskala selbst wählen, in dem man die Werte für **Lin. Max**, **Lin. Step** und **# exp. steps** eingibt. Aus diesen drei Werten für das Ende des linearen Teils, der linearen Schrittweite und der Anzahl der exponentiellen Schritte lässt sich zusätzlich mit den aus den Daten extrahierten Anfangs und Endwerten der Messung eine neue erst lineare und dann exponentielle Zeitskala generieren. Die Berechnung dieser erfolgt analog zu Gleichung 3.1 und Gleichung 3.2 aus Abschnitt 3.1.4. Über die Schaltfläche **Calculate** wird die Datenreduzierung gestartet. Hier wird zuerst der zeitliche Nullpunkt gesucht und alle Daten davor gemittelt um die Intensität der unangeregten Probe (I_0) zu berechnen. Ausgehend von dem zuvor ermittelten Nullpunkt werden die beiden Zeitskalen (experimentell und neu berechnet) miteinander verglichen. Hierbei wird der neu angelegte Zeitstrahl Element für Element durchgegangen und alle experimentellen Daten die zwischen diesen beiden zeitlichen Elementen liegen summiert und durch die Anzahl der summierten Elemente geteilt. Hierdurch wird jedem zeitlichen Element des neuen Zeitstrahls ein neuer, gemittelter Datenpunkt (I) zugewiesen. Für

jeden dieser Datenpunkte wird anschließend noch die Absorptionsdifferenz über das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$\Delta Abs(t) = -\log\left(\frac{I(t)}{I_0}\right) \quad (3.4)$$

berechnet. Für jeden Datenpunkt wird anschließend auch der Fehler aus Mittelung und anschließender Fehlerfortpflanzung berechnet. Generell werden die Fehler zu längeren Zeiten hin kleiner, was zur Ursache hat, dass zu späteren Zeiten viel mehr Datenpunkte gemittelt werden.

Nach Beendigung der Berechnung wird der reduzierte Datensatz einmal mit linearer und einmal mit logarithmischer x-Achse in den jeweiligen Fenstern `Reduced Data linear` und `Reduced Data log` angezeigt. Zum Speichern der Daten kann man mehrere Optionen auswählen. Es ist möglich sich die Daten auch mit ein paar Zeitpunkten vor der zeitlichen Null zu speichern. Dies ist hilfreich, um später zeigen zu können, dass vor dem zeitlichen Nullpunkt keine Dynamik und kein Offset existieren. Eine weitere Option ist das Mitspeichern der oben bereits angesprochenen Fehler. Anschließend hat man noch die Wahl die Daten entweder als ASCII Datei, oder als ANA File zur direkten Bearbeitung in OPTIMUS zu speichern.

Das Programm wurde in MATLAB R2018b programmiert. Da das Laden von größeren Datensätzen mit der konventionellen `load(filename)` funktion nicht mehr praktikabel ist, wurde hier die MATLAB Funktion `datastore(location)` verwendet. Diese ist speziell für das Laden größerer Datenmengen in Tabellenform zuständig. In diesem speziellen Fall mussten für das Datenformat des Tektronix DPO 5204B Oszilloskops die vierte und fünfte Spalte aus dem Datensatz extrahiert werden, um den Zeit sowie Datenvektor zu erhalten. Dies kann in MATLAB mit mit der Funktion `ds.SelectedVariableNames = {'Var4', 'Var5'}`, wobei `ds` für den geladenen Datensatz steht, gemacht werden und muss eventuell für andere Speicheroszilloskope angepasst werden.

3.2 Ultraschnelle Transiente Absorptionsspektroskopie

Die ultraschnelle transiente Absorptionsspektroskopie kann genutzt werden, um sich Dynamiken von verschiedensten Proben im Femtosekunden- bis Nanosekundenbereich anzuschauen. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Anreg-Abtast-Spektroskopie Technik, die mit Hilfe eines Femtosekundenlasers betrieben wird. Der Aufbau, sowie die Datenauswertung für diese Art von Experiment sind relativ komplex, verglichen mit anderen Anreg-Abtast-Techniken wie der Blitzlichtphotolyse, welche in Abschnitt 3.1 näher erläutert wird.

3.2.1 Laser Pump-Lichtquelle

Die Anlage zum Messen der ultrakurzzeit Dynamiken wird mit einem CPA-2110 (Clark-MXR, Michigan) betrieben. Der Laser hat eine Zentralwellenlänge von 775 nm, eine Pulsdauer von ca. 150 fs mit einer Pulsenergie von ca. 800 nJ und läuft mit einer Repetitionsrate von 1 kHz. Der Name des Lasers, CPA-2110, kommt von dem ihm zu Grunde liegenden Prozess der Verstärkung zeitlich gedehnter Pulse (*Chirped Pulse Amplification*), CPA. Der CPA Prozess im Laser funktioniert wie folgt: Ein CW-Diodenlaser wird in einen mit Erbium dotierten Glasfaseroszillator eingekoppelt und erzeugt eine Besetzungsinversion, hier werden durch passive Modenkopplung Laserpulse mit einer Zentralwellenlänge von 1550 nm und ca. 100 fs Pulsdauer erzeugt. Die anschließend frequenzverdoppelten Laserpulse werden in einem Pulsstreckler zeitlich verlängert, anschließend ergibt sich, mit Hilfe einer Pockelszelle, eine Wiederholrate von 1 kHz bei 775 nm. Die daraus resultierenden Seedlaserpulse in einen regenerativen Verstärker eingekoppelt. Der regenerative Verstärker besteht aus einer Kavität, welche einen Ti^{3+} dotierten Saphir Kristall (Ti:Sa) als aktives Medium enthält, welches durch einen Nd:YAG Laser (532 nm, 7 W) optisch gepumpt wird. Durch mehrere Umläufe des Seedlaserpulses im Resonator wird dieser bei jedem Durchgang durch den optisch gepumpten Ti:Sa Kristall verstärkt und danach über eine Pockels-Zelle ausgekoppelt. Anschließend werden die verstärkten Pulse mit Hilfe eines Gitterkompressors auf ca. 150 fs verkürzt und ausgekoppelt.

3.2.2 Der Messaufbau

Ein Schema des Messaufbaus ATAS (Advanced Transient Absorption Spectroscopy) ist in Abbildung 3.8 gezeigt.

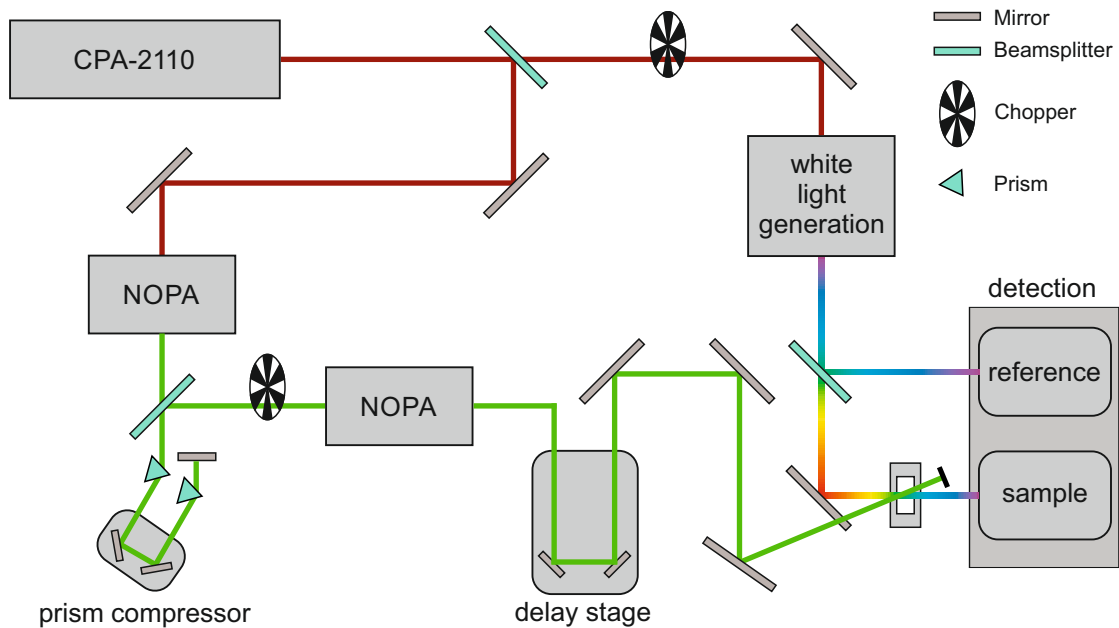


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau des ultraschnellen transienten Absorptionsaufbaus.

Der vom Laser erzeugte Laserstrahl wird zunächst über einen Strahlteiler in den Anreg- und Abtaststrahl getrennt. Die Generierung der richtigen Wellenlänge für die Anregung wird in einem zweistufigen NOPA (Noncollinear Optical Parametric Amplification) durchgeführt. [55] Hierbei wird in der ersten Stufe die richtige Wellenlänge generiert, die dann in der zweiten Stufe nochmal verstärkt wird. Um den durch Dispersion zeitlich auseinander laufenden Laserpuls zeitlich wieder zu komprimieren, ist zwischen den beiden NOPAs ein Prismenkompressor eingebaut. Nachdem der zweite NOPA passiert wurde, gelangt das Anregungslicht auf eine Verzögerungsstrecke (M-531.PD, Physik Instrumente (PI), Karlsruhe), die zum Einstellen der richtigen Verzögerungszeit zwischen Anreg- und Abtastpuls genutzt wird. Soll der Puls um 100 fs verzögert werden, so muss die Wegstrecke um 30 μm vergrößert werden. Die längste Verzögerungszeit, die hiermit realisierbar ist, ist ungefähr 1.8 ns. Nach der Verzögerungsstrecke passiert die Anregung ein $\lambda/2$ -Plättchen, um die Polarisation zwischen Anreg- und Abtastpuls auf den magischen Winkel von 54.7°

3.2. ULTRASCHNELLE TRANSIENTE ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

einzustellen und somit rotationsbedingte Dynamiken zu minimieren. Anschließend wird die Anregung mittels Parabolspiegel auf den Probenort fokussiert und dahinter geblockt. Für den Abtaststrahl wird das Licht der Laserfundamentalen auf ein CaF_2 oder Saphir Fenster fokussiert, um Weißlicht zu erzeugen. Je nach Art des Weißlichts kann hier das passende Fenster gewählt werden. Anschließend wird der Abtaststrahl durch einen Strahlteiler aufgeteilt. Ein Teil wird als Referenz für die Messung detektiert, während der andere Strahl durch die Probe geleitet und anschließend ebenfalls detektiert wird. Die beiden Chopper-Räder, die jeweils im Anreg- und Abtaststrahl stehen, sind so getaktet, dass einmal nur das Abtastlicht, einmal nur die Anregung und einmal beides zusammen aufgenommen wird. Die extra Messung, in der nur das Anregungslicht auf die Probe gegeben wird, ist zur Berechnung des Differenzsignals nicht notwendig, hilft jedoch potentiell Streulicht von der Anregung zu referenzieren und somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis gerade im Bereich des Anregungslichtes zu verbessern. Am Probenort werden Anreg- und Abtaststrahl so justiert, dass sie räumlich und zeitlich (am zeitlichen Nullpunkt) überlappen. Im Normalfall befindet sich die Probe in einer 1×10 mm Küvette, die in einer Ebene senkrecht zum Anregungsstrahl bewegt wird, um Probendegradation zu vermeiden. Bevor die Signale von einer Photodiodenzeile mit 128 Pixeln aufgenommen werden können, passieren sie noch einen Spektrographen (HR320, Horiba, Kyoto). Die Digitalisierung des analogen Messsignals wird durch eine National Instruments Messkarte (NI-PCI-6120, National Instruments, Austin) übernommen. Die Steuerung der Anlage sowie die Datenakquisition wird von einem im Arbeitskreis entwickelten LabVIEW Programm übernommen.

Teil III

Ergebnisse

Kapitel 4

Channelrhodopsin 2

Publikationen die im Rahmen dieser Arbeit zu diesem Thema entstanden sind:

Bühl, E.; Eberhardt, P.; Bamann, C.; Bamberg, E.; Braun, M.; Wachtveitl, J.
Ultrafast Protein Response in Channelrhodopsin-2 Studied by Time-Resolved
IR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, 7180-7184

Bühl, E.; Eberhardt, P.; Bamann, C.; A. Becker; Bamberg, E.; W. Gärtner; G.
Hummer; Wachtveitl, J Functional reconstitution of Channelrhodopsin-2 with
a bulky retinal compound. **2019**, in preparation

4.1 Einleitung

ChR2 wurde 1984 von Foerster et al. im Augenfleck der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* entdeckt und ist ein lichtgetriebener Ionenkanal. [21] Zusammen mit Channelrhodopsin 1 (ChR1) ist ChR2 für die Steuerung der Phototaxis in der Grünalge verantwortlich. Lichteinwirkung bewirkt eine Öffnung des Ionenkanals des ChR2 welche eine Depolarisation der Zelle zur Folge hat. Die Möglichkeit Zellen durch Lichteinwirkung zu depolarisieren ist von fundamentaler Bedeutung in der Optogenetik. Die Optogenetik wurde von *Nature Methods* im Jahre 2010 zur Methode des Jahres gekürt und benutzt genetisch modifizierte Neuronen, welche durch Lichteinwirkung einen Ionengradienten über ihre Membran aufbauen können um aktiviert oder deaktiviert zu werden. Der ChR2 Wildtyp kann hier für die Depolarisierung von Neuronen genutzt werden, welches eine Aktivierung bewirken kann.

ChR2 gehört zur Familie der mikrobiellen Rhodopsine und besteht, wie die meisten mikrobiellen Rhodopsine, aus sieben transmembranen Helices welche den Chromophor *all-trans* Retinal kovalent über eine Schiffische Base an ein Lysin gebunden haben. Durch Anregung mit blauem Licht isomerisiert das *all-trans* Retinal zum *13-cis* Retinal als primäres Photoprodukt. Diese Isomerisierung setzt eine Kaskade an konformationellen Änderungen, sowie Protonierungs- und Deprotonierungsschritten, in Gang, welche den Photozyklus des Channelrhodopsins beschreiben. Während des Photozyklus bilden sich bestimmte Photointermediate aus, welche jeweils spezifische spektrale Signaturen besitzen, die hauptsächlich von der elektronischen Struktur des Retinals und seiner Proteinumgebung abhängen. Das Protein durchläuft vier verschiedene Photointermediate, die mit P₁ bis P₄ bezeichnet werden. Der Photozyklus hierzu ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

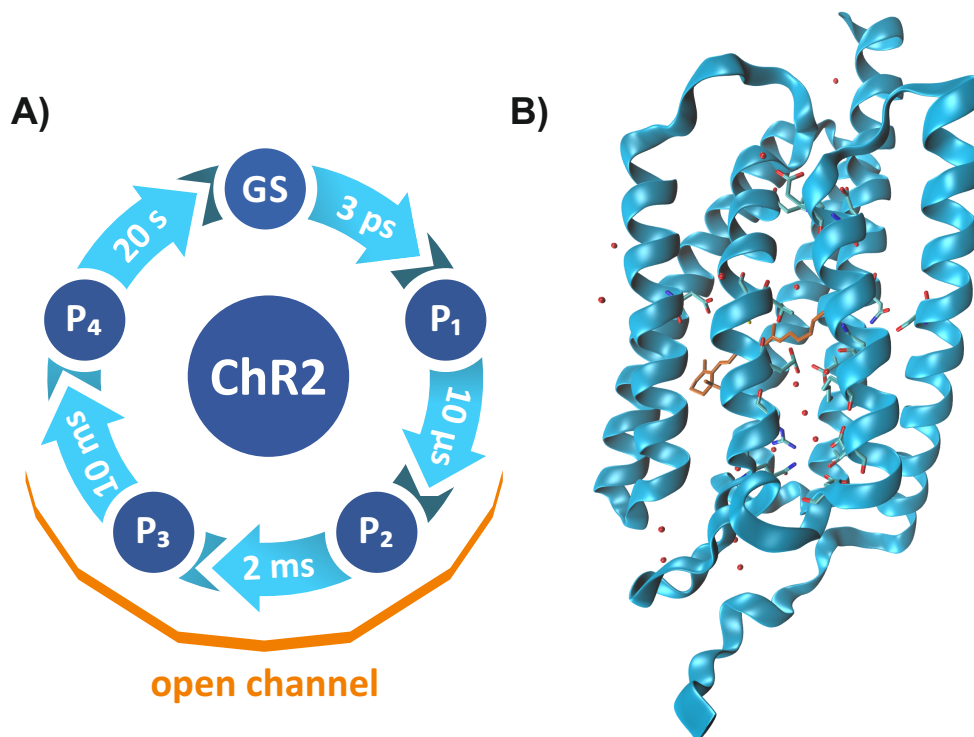


Abbildung 4.1: A) Photozyklus von ChR2 mit den verschiedenen Photointermediaten. B) Darstellung der Kristallstruktur (PDB: 6EID [56]) von ChR2 mit Wassermolekülen und wichtigen Aminosäureresten.

2017 konnte erstmals die Struktur von ChR2 von Volkov et al. gelöst werden.[56]

Zuvor war nur die Struktur einer Chimäre aus ChR2 und ChR1 bekannt, welche nur zwei Transmembranhelices (Helix F und G) von ChR2 beinhaltet.[57] Die Aufklärung der Struktur lieferte wichtige Hinweise für die Untersuchung der Kopplung zwischen Retinalisomerisierung und Proteinfunktion. Besonders interessant hierbei ist die Ultrakurzzeitdynamik des ChR2.

Direkt nach Anregung findet auf der S_1 Potentialenergiefläche eine Vibrationsrelaxation mit einer Zeitkonstante von 150 fs statt. Darauf folgt der Zerfall des angeregten Zustandes mit 400 fs, welcher das 13-*cis* Photoprodukt sowie den all-*trans* Grundzustand populierte. Nach Beendigung der Kühlprozesse bildet sich mit einer Zeitkonstante von 2,7 ps das P_1 Intermediat aus, welches auf der Mikrosekunden Zeitskala zum P_2 weiter reagiert. [58] Während des P_2 Intermediates ist die Schiff'sche Base des Retinals deprotoniert und wird mit dem P_3 Intermediat wieder protoniert. Während des P_3 Intermediates befindet sich ChR2 in seinem leitenden Zustand, da der Kanal des Proteins geöffnet ist. Dies lässt sich nicht im sichtbaren, jedoch sehr wohl im infraroten Spektralbereich anhand der Konformationsänderungen des Proteinerückgrats bei 1665 cm^{-1} , der sogenannten Amid I Bande, beobachten. [59] Überraschenderweise konnte eine Änderung dieser, sowie einiger Nebenbanden schon mit 500 fs nachgewiesen werden.[60] Aufgrund dieser Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass ein ultraschneller Energietransfer vom Retinal auf das Proteinerückgrat während der Isomerisierung stattfinden muss. In Kooperation mit Elena Bühl wurde die Ultrakurzzeitdynamik der C=O Infrarotbanden der protonierten Aspartate und Glutamate untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Differenzbanden schon direkt nach Anregung im Subpikosekundenbereich gebildet werden. Die Banden konnten funktionellen Aminosäureseitenketten in der näheren Retinalumgebung wie z.B. D156 und E90 zugeordnet werden. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein überraschend schneller und effizienter Energietransfer vom Retinal auf die Umgebung mithilfe eines Wasserstoffbrückennetzwerkes möglich ist und eine besonders starke Verbindung zwischen Chromophor und Protein besteht. [61] Ob die Retinalisomerisierung notwendig für den ultraschnellen Energieübertrag ist, oder ob es auch Kanalfunktion zwar mit Anregung des Chromophors aber ohne Isomerisierung geben kann, konnte jedoch nicht final geklärt werden. Um diese Frage weiter zu untersuchen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit verschiedene modifizierte und sterisch anspruchs-

volle Retinale, welche die Isomerisierung um die C13-C14 Bindung hemmen sollen, untersucht.

4.2 9,12-Phenylretinal

Das (3-(4-(2-(2,6,6-trimethylcyclohexenyl)vinyl)phenyl)-2-butenal) (kurz Phenylretinal) ist ein Retinalanalogon welches bereits erfolgreich in Bacteriorhodopsin eingesetzt wurde um die Pumpfunktion der Protonenpumpe zu unterbinden. Das *all-trans* Isomer ist hauptsächlich planar und bildet unter Belichtung eine Mischung aus 20:13:67 *all-trans*:7-*cis*:13-*cis* aus. Das 13-*cis* kann sich jedoch nur mit Rotation um die C12-C13 Einfachbindung bilden (Abbildung 4.2), was normalerweise in der Retinalbindetasche aufgrund sterischer Hinderungen nicht möglich ist. Baut man dieses Retinalanalogon in BR ein, so erhält man weder einen Photozyklus, noch eine aktive Protonenpumpe. [62, 63]

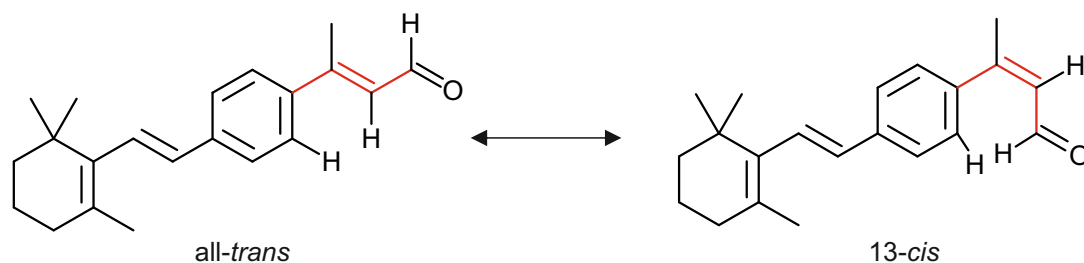


Abbildung 4.2: Struktur des *all-trans* und 13-*cis* 9,12-Phenylretinals, isomerisierte Doppelbindung markiert in rot.

Im Zuge dieser Arbeit sollte der Einfluss dieses Retinalanalogons auf ChR2 getestet werden, um zu sehen ob damit Einfluss auf Proteinaktivität oder Photozyklus genommen werden kann. Hierzu wurde das Retinalanalogon von Dr. Christian Bamann (AK Bamberg, MPI für Biophysik, Frankfurt) in das Protein eingebaut und elektrophysiologische Messungen zur Überprüfung der Kanalaktivität durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass das ChR2 mit dem eingebauten Phenylretinal eine ähnliche Kanalaktivität zeigt, wie der Wildtyp und nicht durch den Einbau des modifizierten Retinals gehindert wird, wie es für BR der Fall war.

Betrachtet man das statische Absorptionsspektrum des ChR2 mit Phenylretinal in Abbildung 4.3 stellt man fest, dass es im Vergleich zum ChR2 mit normalen Retinal blau verschoben ist und die sonst für das ChR2 übliche Schwingungsfineinstruktur fehlt. Die Absorptionsmaxima dieser Schwingungsfineinstruktur sind bei 413, 448 und 472 nm zu finden. Das Absorptionsmaximum des Phenylretinals hingegen liegt bei 393 nm. Normalerweise würde man durch die Erweiterung des π -Systems im Phenylretinal eine Rotverschiebung des Absorptionsspektrums erwarten, hier jedoch ist eine Blauverschiebung zu beobachten. Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass das Phenylretinal in einer verdrillten Konformation in der Bindetasche sitzen muss, was aufgrund des sterisch anspruchsvollen Rests auch nicht verwunderlich ist.

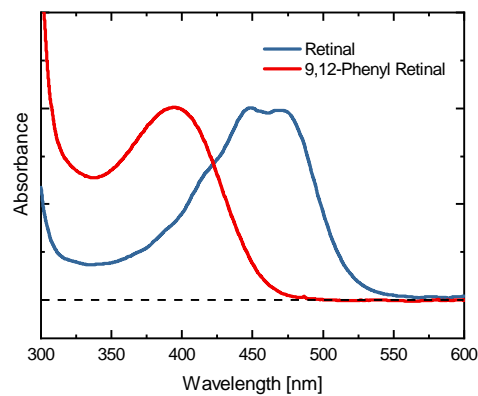


Abbildung 4.3: Absorptionsspektrum des 9,12-Phenylretinal eingebaut in ChR2 im Vergleich zu ChR2 mit normalem all-*trans* Retinal.

Um herauszufinden ob eine Isomerisierung in ChR2 überhaupt möglich ist, wurde die Ultrakurzzeitdynamik von Dr. Elena Bühl im Rahmen ihrer Doktorarbeit gemessen. [64] Hierbei konnte ein multiexponentieller Zerfall des angeregten Zustandes detektiert werden, welcher in einem isomerisierten Photoprodukt (P_1') resultiert. Das Photoprodukt, welches sich am Ende der Ultrakurzzeitmessung (1,5 ns) ausgebildet hat, absorbiert bei ca. 450 nm und ist somit zum Grundzustandsbleichen rot verschoben. Der anschließende Photozyklus wurde mit Hilfe der breitbandigen Blitzlichtphotolyse spektroskopiert. Die hierfür verwendete Probe wurde in einem Puffer mit 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1 % DM und pH 7,4 umgepuffert und in der in Unterabschnitt 3.1.2 beschriebenen Anlage gemessen. Das Ergebnis der

Messung ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Der früheste Zeitpunkt der breitbandigen Blitzlichtphotolyse Messung sind 333 ns. Zu dieser Zeit konnte kein rotverschobenes Photointermediat (P_1') mehr detektiert werden. Dies bedeutet, dass es bereits zuvor schon zerfallen sein muss. Das erste in der Blitzlichtphotolyse detektierte Intermediat bildet sich mit einer Lebenszeit von $\tau_1 = 500$ ns. Die Absorption ist ähnlich der des Grundzustandes, was im Zerfall (und der anschließenden Rückkehr) des Grundzustandsbleichens gesehen werden kann.

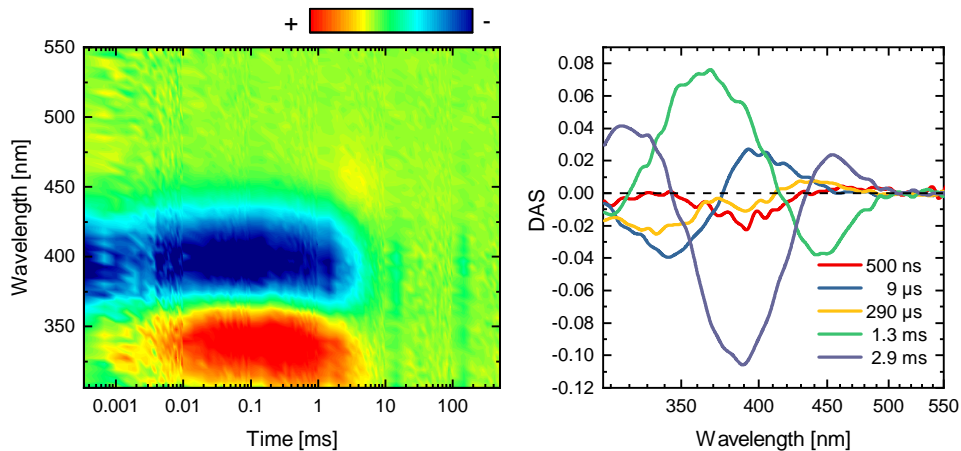


Abbildung 4.4: Blitzlichtphotolyse Messung und zugehörige zerfallsassoziierte Spektren des 9,12-Phenylretinals in ChR2. Farbkodierung des Konturplots ist wie folgt: Blau markiert Bereiche mit negativer, grün mit keiner und rot mit positiver Absorptionsdifferenz.

Ein derartiges Intermediat ist für den ChR2 Wildtyp nicht bekannt und findet daher auch keine Nummerierung im Photozyklus, im Folgenden wird es hier als P_x Intermediat bezeichnet. Zieht man Vergleiche mit anderen mikrobiellen Rhodopsinen wie zum Beispiel Bakteriorhodopsin, so findet man jedoch auch ein Intermediat welches zwischen dem rot- und blauverschobenen K und M liegt und eine grundzustandsähnliche Absorption hat. Im Falle des BR ist es das L Intermediat, welches Verdrillungen im Retinal aufweist. Möglicherweise handelt es sich durch das größere Retinal hier auch um einen ähnlichen Zwischenschritt. Das P_x Intermediat zerfällt mit einer Zeitkonstante von $9 \mu\text{s}$ und es bildet sich das blauverschobene P_2' Intermediat, dessen Absorption sich um 340 nm befindet. Mit einer Zerfallszeit von $290 \mu\text{s}$ erfährt dieses Intermediat einen leichten Blaushift und es bildet sich das P_2'' Intermediat. Mit einer Lebenszeit von $1,3$ ms zerfällt das P_2'' zusammen mit der Bildung

des P_3 ' Intermediates. Dieses akkumuliert im Gegensatz zum Wildtyp nur sehr wenig und ist im Vergleich zum Wildtyp mit einer Absorption um 450 nm auch weniger rotverschoben zum Grundzustand. Zuletzt kehrt das Protein mit einer Lebenszeit von 2,9 ms in den Grundzustand zurück. Das P_4 Intermediat, welches im Wildtyp normalerweise noch schwach beobachtet werden kann und von ca. 25% der Moleküle im P_3 bevölkert wird [65], konnte hier nicht nachgewiesen werden. Insgesamt ist der Photozyklus des ChR2 mit 9,12-Phenylretinals schneller, als der des ChR2 Wildtyps, welcher für die Moleküle die nach dem P_3 Intermediat in den Grundzustand zurückkehren ca. 6 ms dauert und für die Moleküle die noch das P_4 Intermediat bevölkern ca. 20 s dauert.

4.3 *Trans*-Locked Retinal

Aufgrund des Isomerisierungsverhaltens des 9,12-Phenylretinals in ChR2 wurde nach einem neuen Retinalanalogon gesucht, welches vorzugsweise auch als Einzelmolekül nicht in der Lage ist die C13=C14 Isomerisierung zu vollführen. Hierbei fiel die Wahl auf das sogenannte *trans*-locked Retinal (Abbildung 4.5) welches ebenfalls bereits erfolgreich in BR als BR5.12 eingesetzt wurde und zu keinem Photozyklus geführt hat. [66, 67]

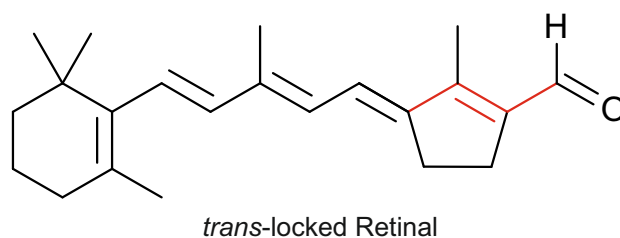


Abbildung 4.5: Struktur des *trans*-locked Retinals. *Trans* gelockte Doppelbindung ist in rot markiert.

Das *trans*-locked Retinal wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Gärtner (Universität Leipzig) hergestellt und wie auch das 9,12-Phenylretinal wurde dieses ebenfalls von Dr. Christian Bamann (MPI für Biophysik, Frankfurt) in ChR2 eingebaut. Der Einbau erwies sich unglücklicherweise als schwierig, sodass keine Probe mit einem eindeutigen Absorptionsspektrum erhalten werden konnte.

4.3. TRANS-LOCKED RETINAL

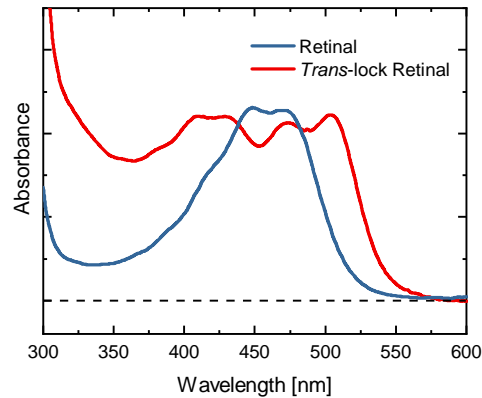


Abbildung 4.6: Absorptionsspektrum des in ChR2 eingebauten *trans*-locked Retinals im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 4.6 ist das Absorptionsspektrum des ChR2 mit *trans*-locked Retinal gezeigt. Es ist zu erkennen, dass es sich höchstwahrscheinlich um mindestens zwei verschiedene Spezies handelt, eine mit einer Absorption zwischen 350 - 450 nm und eine weitere zwischen 450 - 550 nm. Zweitere scheint eine Schwingungsfeinstruktur auszubilden, wie es für den ChR2 Wildtyp bekannt ist. Hieraus lässt sich folgern, dass die weiter rotverschobene Spezies wahrscheinlich die ist, welche das *trans*-locked Retinal richtig eingebaut hat. Um dies näher zu untersuchen, wurden Ultrakurzzeitmessungen durchgeführt.

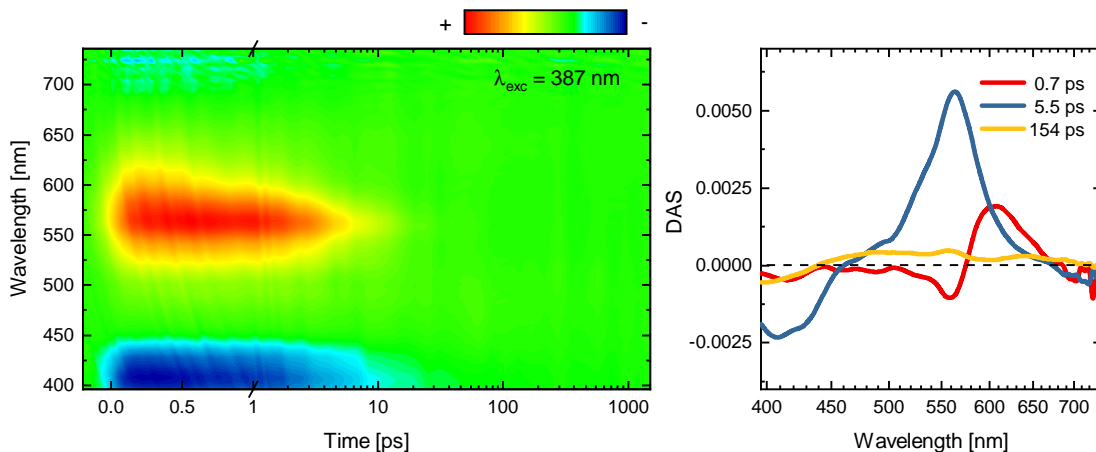


Abbildung 4.7: Ultrakurzzeitmessung an ChR2 mit *trans*-locked Retinal, angeregt bei 387 nm.

Es wurden zwei verschiedene Anregungswellenlänge an den beiden Enden des Spek-

trums gewählt, um die beiden vermuteten Spezies separat voneinander anregen zu können. Hierbei fiel die Wahl auf 387 nm an der blauen Flanke, sowie 510 nm an der roten Flanke. In Abbildung 4.7 ist die Ultrakurzzeitmessung mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 387$ nm zu sehen. Anhand des Grundzustandsbleichens, welches sich unterhalb von 450 nm befindet, ist erkennbar, dass erfolgreich nur die blaue Spezies angeregt wurde. Wie weit die Absorption in den blauen Spektralbereich hinein reicht konnte hier leider aufgrund des Messfensters nicht festgestellt werden. Das prominenteste Signal ist die Absorption des angeregten Zustandes, mit einer Zentralwellenlänge bei ca. 565 nm. Der erste Prozess, welcher mit einer Lebenszeit von $\tau_1 = 0,7$ ps stattfindet, beschreibt das Verlassen der Franck-Condon-Region und ist durch einen Blaushift des Absorptionsmaximums gekennzeichnet. Der Grund dieses Blaushifts ist die Schwingungsrelaxation des angeregten Zustandes. Dieser Prozess ist, wahrscheinlich durch das sterisch gehinderte Retinal, viel langsamer als im Wildtyp, welcher für den gleichen Prozess eine Lebenszeit von 150 fs aufweist. [58] Oberhalb von 670 nm ist die stimulierte Emission angedeutet, welche aufgrund des schlechten Signal zu Rausch Verhältnisses der Randkanäle jedoch leider nicht gut aufgelöst ist. Anschließend kehrt das Molekül mit einer Zeit von $\tau_2 = 5,5$ ps in den Grundzustand zurück, jedoch ohne ein Photoprodukt zu bilden. Dies ist ein Indikator dafür, dass keine Isomerisierung erfolgen kann. Die letzte Lebenszeit $\tau_3 = 154$ ps beschreibt höchstwahrscheinlich kleinere konformationelle Änderungen des Proteins, da es sich hier möglicherweise um ein falsch oder verdrillt eingebautes Retinal handelt.

Vergleicht man diese Messung mit der Messung in Abbildung 4.8, welche 510 nm als Anregungswellenlänge hat, so kann man einige Unterschiede erkennen. Offensichtlich wurde die weiter im Roten absorbierende Spezies erfolgreich angeregt, was man an der spektralen Lage, sowie an der Schwingungsfeinstruktur, welche das Grundzustandsbleichen aufweist, erkennen kann. Spektral befindet sich das Grundzustandsbleichen hier nicht, wie in der ersten Messung, unterhalb von 450 nm, sondern reicht von ca 520 nm bis etwas unter 400 nm. Ein weiterer Aspekt ist die stimulierte Emission, welche hier oberhalb von 670 nm klar beobachtet werden kann. Die DAS zeigen, dass auch hier die Blauverschiebung durch das Verlassen der Franck-Condon-Region, welches in diesem Fall mit der ersten Lebenszeit $\tau_1 = 0,2$ ps abläuft.

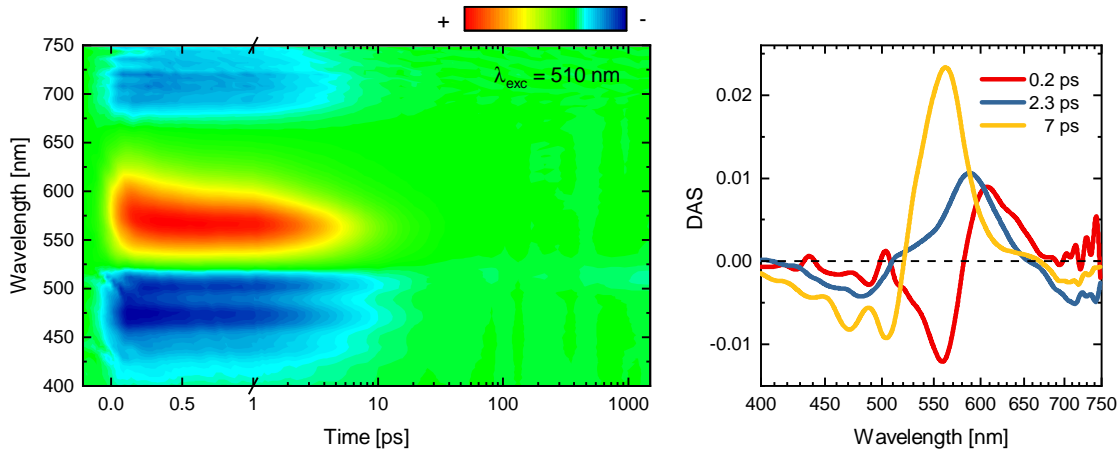


Abbildung 4.8: Ultrakurzzeitmessung an ChR2 mit *trans*-locked Retinal, angeregt bei 510 nm.

Der Zerfall des angeregten Zustands in den Grundzustand wird biphasisch mit den beiden Lebenszeiten $\tau_2 = 2,3$ ps und $\tau_3 = 7$ ps beschrieben. Zwischen diesen beiden ist auch noch eine kleine Blauverschiebung zu beobachten. Auch hier wird kein Photoprodukt gebildet, da es auch hier nicht zur Isomerisation kommen kann.

4.4 Diskussion & Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene modifizierte Retinale in ChR2 auf deren Isomerisierungsverhalten und Aktivität untersucht. Da für Channelrhodopsin 2 bis heute ungeklärt ist, ob eine Isomerisierung notwendig für die Kanalöffnung ist, wurden verschiedene "geblockte" Retinale spektroskopisch untersucht. Zuerst wurde das bereits in Bacteriorhodopsin erfolgreich eingesetzt 9,12-Phenylretinal in Zusammenarbeit mit Dr. Elena Bühl untersucht. Das freie 9,12-Phenylretinal ist sterisch gehindert und kann nur unter Drehung um die C12-C13 Einfachbindung von *all-trans* zu 13-*cis* isomerisieren. In BR bietet die Bindetasche dafür nicht genug Platz, sodass das Retinal nach Anregung nicht isomerisieren kann, dies schaltet auch die Pumpaktivität der Protonenpumpe ab. In ChR2 hingegen kann nach Anregung ein Photoprodukt durch Isomerisierung gebildet werden und es läuft ein modifizierter Photozyklus ab. Hierbei wurde ein zusätzliches P_x Intermediat zwischen P_1' und P_2' gefunden, welches zumindest von seiner spektralen Lage her dem L Interme-

diat des BR ähnelt. Elektrophysiologische Messungen von Dr. Christian Bamann konnten zeigen, dass ChR2 auch mit dem Phenylretinal seine Kanalaktivität beibehält. Interessanterweise ist der Photozyklus mit modifiziertem Retinal schneller als der des Wildtyps, Grund hierfür könnte die durch den sterisch anspruchsvollen Rest aufgebaute Spannung im System sein. Um die Isomerisierung gänzlich zu verhindern wurde anschließend das *trans*-locked Retinal in ChR2 eingesetzt. Dieses verhindert durch seinen Fünfring die Isomerisierung um die C13=C14 Doppelbindung. Der Einbau des modifizierten Retinals in das Protein erwies sich als schwierig, weshalb keine Probe mit eindeutigem Absorptionsspektrum erhalten werden konnte. Es wurden zwei Spezies identifiziert, welche beide separat voneinander auf der Ultrakurzzeitskala spektroskopiert wurden. Die rotverschobenere der beiden Spezies erwies sich als die Spezies mit dem korrekt eingebauten Retinal, welches anhand der Schwingungsfeinstruktur der Absorptionsbande, die auch im ChR2 Wildtyp zu finden ist, identifiziert werden konnte. Beide Spezies zeigten nach Anregung und Verlassen des Franck-Condon-Bereichs nur eine Rückkehr in den Grundzustand und keine Photoproduktbildung und auch keine Isomerisierung. Leider ist noch nicht bekannt ob das Protein trotzdem zu einer Kanalöffnung fähig ist oder nicht, da noch keine elektrophysiologischen Daten vorliegen. Wäre das Protein trotzdem aktiv, so hätte man einen ersten Beweis für die Entkopplung von Isomerisierung und Kanalöffnung. Wäre das Protein inaktiv, so hätte man zumindest einen Hinweis auf die Notwendigkeit der Isomerisierung für die Kanalöffnung. Zusätzlich zu dem *trans*-locked Retinal war auch geplant ein *cis*-locked Retinal, welches das *cis* Isomer in einem Fünfring fest eingebaut hatte, zu spektroskopieren. Es war jedoch leider nicht möglich dieses erfolgreich in Channelrhodopsin 2 einzubauen.

Kapitel 5

Krokinobacter Eikastus Rhodopsin 2

Publikationen die im Rahmen dieser Arbeit zu diesem Thema entstanden sind:

Henrich, E.; Sörmann, J.; Eberhardt, P.; Peetz, O.; Mezhyrova, J.; Morgner, N.; Fendler, K.; Dötsch, V.; Wachtveitl, J.; Bernhard, F.; et al. From Gene to Function: Cell-Free Electrophysiological and Optical Analysis of Ion Pumps in Nanodiscs. *Biophys. J.* **2017**, 113, 1331–1341.

Kaur, J.; Kriebel, C. N.; Eberhardt, P.; Jakdetchai, O.; Leeder, A. J.; Weber, I.; Brown, L. J.; Brown, R. C. D.; Becker-Baldus, J.; Bamann, C.; et al. Solid-State NMR Analysis of the Sodium Pump Krokinobacter Rhodopsin 2 and Its H30A Mutant. *J. Struct. Biol.* **2018**, 206, 55–65.

Asido, M.; Eberhardt, P.; Kriebel, C. N.; Braun, M.; Glaubitz, C.; Wachtveitl, J. Time-Resolved IR Spectroscopy Reveals Mechanistic Details of Ion Transport in the Sodium Pump: Krokinobacter Eikastus Rhodopsin 2. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, 21, 4461–4471.

Eberhardt, P.; Slavov, C.; Sörmann, J.; Bamann, C.; Wachtveitl, J. Temperature Dependence of KR2 *Biophys. J.* **2019**, in preparation

Jakdetchai, O.; Eberhardt, P.; Kaur, J.; Leeder, A. J.; Brown, L. J.; Brown, R. C. D.; Becker-Baldus, J.; Bamann, C.; Wachtveitl, J.; Glaubitz, C. Probing the photointermediates of light-driven sodium ion pump KR2 by DNP-enhanced solid-state NMR **2019**, in preparation

5.1 Einleitung

Krokinobacter eikastus Rhodopsin 2 (KR2) ist, wie ChR2 auch, in der Familie der mikrobiellen Rhodopsine angesiedelt. Es ist ein vergleichsweise neu entdecktes Rhodopsin, welches erst im Jahr 2013 im marinen Flavobakterium *Krokinobacter eikastus* in der Bucht von Tokyo gefunden wurde. [36] *K. eikastus* besitzt 2 verschiedene Retinalproteine, KR1 und KR2, während es sich bei KR1 um eine normale Protonenpumpe handelt, wurde das KR2 als nach außen gerichtete Natriumpumpe klassifiziert. Im Gegensatz zu z.B. PR und BR besitzt KR2 ein NDQ Motif (Abbildung 5.1), statt des sonst gängigen DTD(E) Motifs für Protonenakzeptor, Gegenion und Protonendonator.[68] Desweiteren besitzt das Protein eine extrazelluläre Bindestelle für Natriumionen [69], welche jedoch nicht transportiert werden.

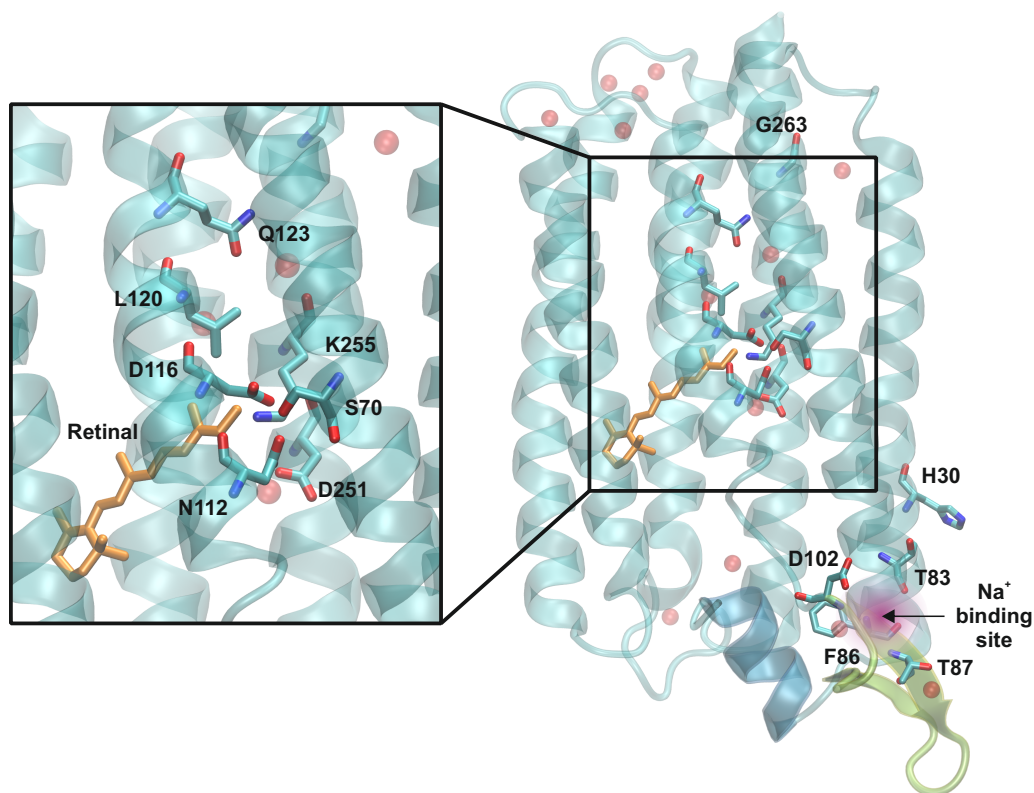


Abbildung 5.1: Rechts: Darstellung der Kristallstruktur (PDB: 6RF7 [70]) von monomerem KR2 bei pH 8,9 mit wichtigen Aminosäureresten. N-terminale Helix dargestellt in Blau, B-C Loop in gelb, Na⁺ Bindestelle in lila und Wassermoleküle in rot. Links: Zoom auf die Retinal-Bindestasche mit NDQ Motif.

Neben Natriumionen kann KR2 auch Lithiumionen pumpen. In Abwesenheit größe-

rer Kationen funktioniert das Protein als Protonenpumpe. Da Natriumionen für die Nervreizleitung eine wichtige Rolle spielen, zum Beispiel um Aktionspotentiale in anregbaren Zellen wie Neuronen aufzubauen, ist KR2 auch für die Optogenetik als neuronaler Silencer besonders interessant. [48] Wie die meisten anderen mikrobiellen Rhodopsine durchläuft auch KR2 einen Photozyklus. Hierbei wurde die Benennung der Intermediate im Photozyklus in Analogie zu BR vorgenommen, demnach besteht der Photozyklus aus einem rot verschobenen K Intermediat, worauf die blau verschobenen L und M Intermediate folgen. Das letzte Intermediat im Photozyklus ist das wiederum rot verschobene O Intermediat. [36] Erste Ultrakurzzeitstudien konnten zeigen, dass sich vor dem K Intermediat bereits das noch weiter rot verschobene J Intermediat befindet. [71, 72]

5.2 Primärreaktion des KR2

Wie fast alle mikrobiellen Rhodopsine vollführt auch KR2 eine *all-trans* nach *13-cis* Isomerisierung nach Anregung durch Licht einer geeigneten Wellenlänge. Diese durch die Lichtanregung stimulierte Isomerisierung wird Primärreaktion genannt. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Primärreaktion von KR2 unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Hierbei wurde der Wildtyp unter verschiedenen Salzbedingungen (Unterabschnitt 5.2.1), die H30A Mutante (Unterabschnitt 5.2.2) sowie zwei Retinalanaloga (Unterabschnitt 5.2.4 und Unterabschnitt 5.2.5) untersucht.

5.2.1 Wildtyp

Für die transienten Ultrakurzzeitmessungen im UV/vis Bereich wurden solubilisierte Proben, welche von Dr. Jagdeep Kaur (AK Glaubitz) bereitgestellt wurden, verwendet. Der wässrige Puffer, welcher 50 mM TRIS, 0,1% DDM sowie 150 mM Salz (KCl oder NaCl) enthält, wurde auf einen pH Wert von 8.5 eingestellt. Die Probe wurde mit Hilfe von Zentrifugalfiltration aufkonzentriert, sodass eine optische Dichte von ca. 0,2 auf 1 mm erreicht wurde. Als Anregungswellenlänge wurde 525 nm mit einer Pulsenergie von 60 nJ gewählt. Abbildung 5.2 zeigt die Ultrakurzzeitmessung des KR2 Wildtyps mit 150 mM NaCl, sowie die dazugehörige Lifetime Density Map

(LDM).

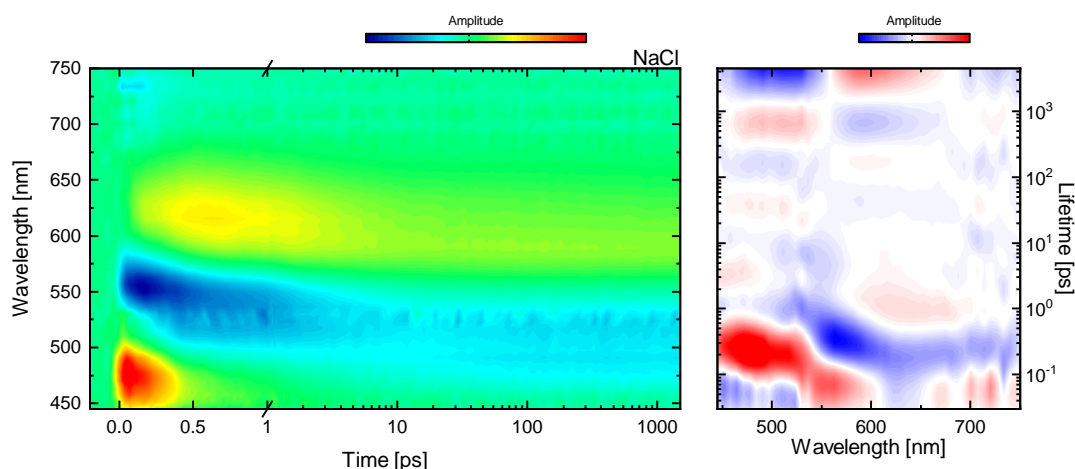


Abbildung 5.2: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) des KR2 Wildtyps mit 150 mM NaCl bei pH 8,5. Farbkodierung des Konturplots der Kurzzeitmessung ist wie folgt: Blau markiert sind Bereiche mit negativer, grün mit keiner und rot mit positiver Absorptionsdifferenz. LDMs wurden über die Lebenszeit-Verteilungsanalyse der Ultrakurzzeitdaten in OPTIMUS erhalten. Positive (rot) Amplituden markieren Regionen mit einem Zerfall der Absorption oder Anstieg des Grundzustandsbleichens, negative (blau) Amplituden zeigen Regionen mit einem Anstieg der Absorption oder einem Zerfall des Bleichens.

Direkt nach der Absorption des Photons sind eine positive Bande um 460 nm und zwei negative Banden um 550 nm sowie oberhalb von 700 nm beobachtbar. Hierbei handelt es sich um die Absorption des angeregten Zustandes (excited-state absorption, ESA), das Bleichen des Grundzustandes (ground-state bleach, GSB) und die stimulierte Emission (stimulated emission, SE). In der LDM kann man sehen, dass diese Prozesse mit einer Lebenszeitverteilung zwischen 200 und 300 fs anfangen zu verschwinden und sich eine neue, zum Grundzustand rot verschobene, Photoproduktbande um 620 nm bildet. Diese schiebt mit einer Lebenszeitverteilung, welche ihr Maximum bei ca. 1 ps hat, 30 nm ins Blaue zu 590 nm. Ein ähnlicher Prozess konnte bereits für BR beobachtet werden [73] und wurde einer Schwingungsrelaxation des Chromophors zugeschrieben. Das erste Photointermediat, welches sich mit dem Zerfall des angeregten Zustands, bildet ist das J Intermediat. Dieses besitzt das bereits isomerisierte 13-*cis*-Retinal und befindet sich höchstwahrscheinlich in einem angeregten Schwingungszustand des S_0 . Dieses Intermediat zerfällt auf der unteren Pikosekunden-Zeitskala mit einer Blauverschiebung von 30 nm und es bildet sich

das schwingungsrelaxierte K Intermediat, welches bis zum Ende der Messung bestehen bleibt. Das K Intermediat ist auch das erste Intermediat, welches mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse spektroskopiert werden kann. Es lebt demnach bis in den Mikrosekundenbereich. Anhand der stimulierten Emission können die Pfade von reaktiven und nicht reaktiven angeregten Zuständen bestimmt werden. [74] Hierbei ist der reaktive Pfad der, welcher zur Isomerisierung des Chromophors führt. Der nicht reaktive Pfad hat eine längere Lebenszeit und führt zurück in den *all-trans* Grundzustand. Am besten kann man dies im biphasischen Zerfall der stimulierten Emission sehen, da hier wenig Überlapp mit anderen Signalen herrscht. Leider ist bei dieser Messung die stimulierte Emission mit einem Offset behaftet, welcher es nicht möglich macht, die längere Komponente zu bestimmen. Hierauf wird bei der salzfreien Messung nochmal genauer eingegangen, da bei dieser der Offset nicht vorhanden und deshalb die Bestimmung der Lebenszeit der stimulierten Emission möglich war. Die Messung mit 150 mM KCl (Abbildung 5.3) anstatt von NaCl als Salz zeigt ähnliche Eigenschaften wie die NaCl Messung. KCl wurde als Salz ausgesucht, da Kaliumionen nicht transportiert werden sollten [36], man jedoch die gleiche Ionenstärke in der Lösung behält.

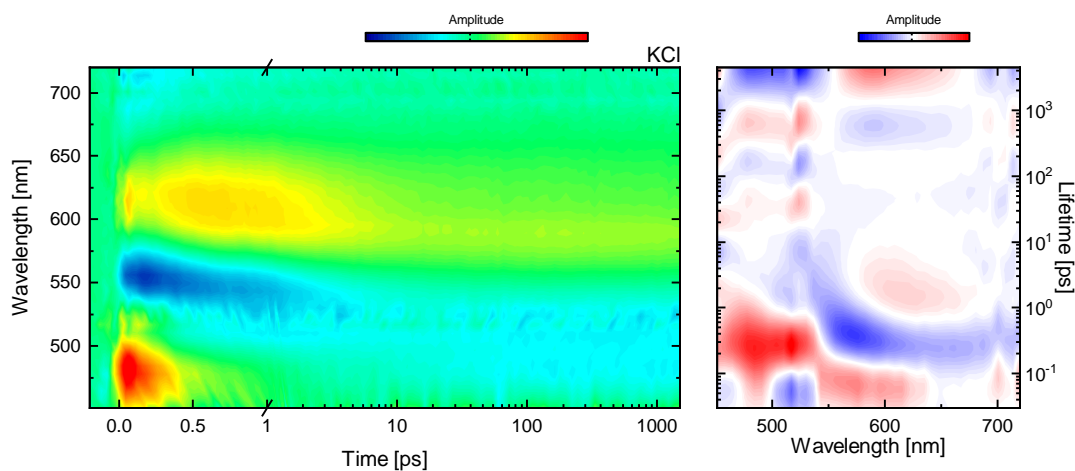


Abbildung 5.3: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) des KR2 Wildtyps mit 150 mM KCl bei pH 8,5.

Vergleicht man die LDMs der NaCl und KCl Messung, so fallen einige Gemeinsamkeiten auf. Die Zeiten unterhalb von 100 fs sind leider noch etwas mit dem kohärenten Artefakt vermischt, welches sich nicht komplett korrigieren lässt, daher kann

man über diese Zeiten hier keine verlässliche Aussage treffen. Die Dynamik auf der längeren Zeitskala verhält sich sehr ähnlich zu der von KR2 mit NaCl. Die Lebenszeitverteilung, welche den Zerfall des angeregten Zustandes beschreibt, ist zwischen 450 und 550 nm zu finden. Sie startet bei ca. 100 fs und erstreckt sich bis zu ca. 1,5-2 ps, je nach Wellenlänge. Dieser Prozess ist etwas langsamer als in Anwesenheit von NaCl, dort endet die Verteilung bereits bei 1 ps. Mit dem Zerfall des angeregten Zustandes bildet sich auch hier, wie schon in der NaCl Messung, das J Intermediat, welches über einen Blauverschiebung zum K Intermediat relaxiert. Ein etwas anderes Bild ergibt sich bei der Messung ganz ohne Salz. Hier wäre eigentlich zu erwarten, dass die Primärreaktion ohne Salz der mit KCl ähnelt. In beiden Fällen sollten während des Photozyklus Protonen gepumpt werden. [36] Abbildung 5.4 zeigt jedoch deutlich, dass der angeregte Zustand um einiges länger populiert ist, als in den vorherigen Messungen unter Salzbedingungen.

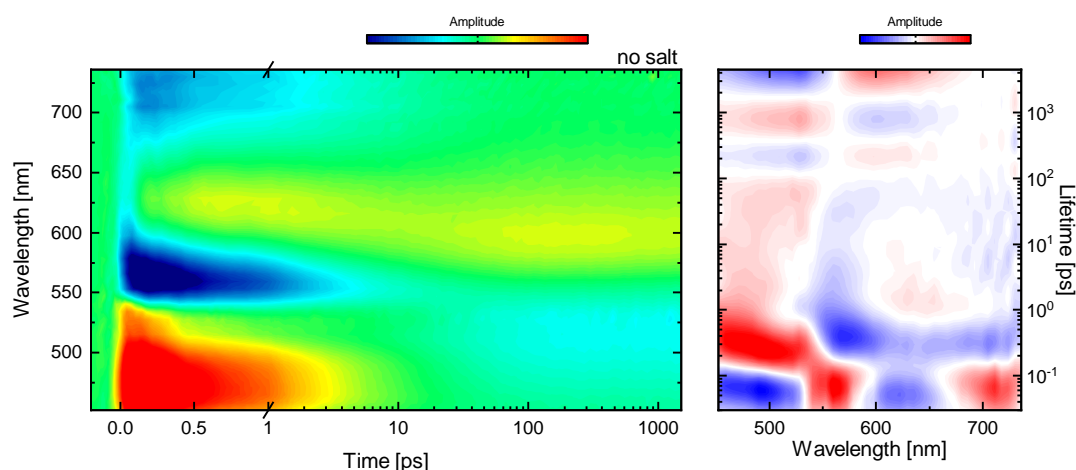


Abbildung 5.4: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) des KR2 Wildtyps ohne Salz bei pH 8,5.

Die Lebenszeitverteilung für den Zerfall des angeregten Zustandes, welche am besten im Bereich von 450-530 nm zu beobachten ist, erstreckt sich hier von ca 200 fs bis hin zu fast 100 ps in der LDM. Wie auch schon bei den anderen Messungen handelt es sich hier um einen biphasischen Prozess, wobei die schnelle Komponente das J Intermediat populiert und die langsamere Komponente in den unisomerisierten *all-trans* Grundzustand zurückkehrt. Besonders deutlich werden diese Prozesse, wenn man die einzelnen Transienten bei ausgewählten Wellenlängen betrachtet.

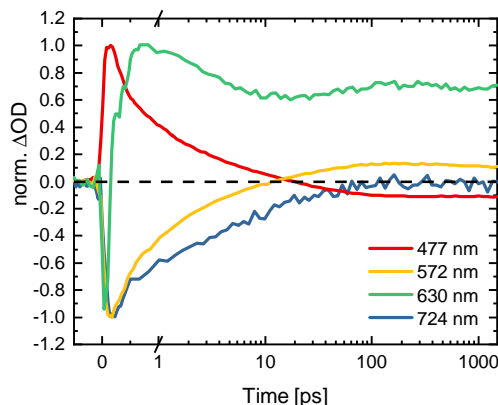


Abbildung 5.5: Normierte transiente Absorptionänderungen der Ultrakurzzeitmessung des KR2 WT bei pH 8.5 ohne Salz nach Anregung bei 525 nm.

Hierbei wurden 477 nm für die Absorption des angeregten Zustandes, 572 nm für das Grundzustandsbleichen, 630 nm für die Produktbildung (J, K) und 724 nm für die stimulierte Emission gewählt (Abbildung 5.5). Betrachtet man die 477 nm (rot) und die 630 nm Kurve (grün) so sieht man, dass sich das Photoprodukt (J Intermediat) mit dem schnellen Zerfall der ESA aufbaut. Die stimulierte Emission (724 nm, blaue Kurve) zeigt jedoch eindeutig noch einen zweiten, langsameren Zerfall. Dieser ist ebenfalls in der ESA enthalten, jedoch auch mit einigen anderen Prozessen überlagert. Laut Tahara et al. [74] handelt es sich hierbei um den nicht reaktiven S_1 Pfad. Diese unreaktiven Pfade wurden schon für mehrere Retinalproteine, wie z.B. Proteorhodopsin und Halorhodopsin, beobachtet, und führen nicht zu einer Isomerisierung des Retinals sondern zurück in den unisomerisierten Grundzustand. [75–77] Bisher wurde dieses Phänomen über eine Verzweigung der S_1 Reaktionskoordinaten nach Anregung in die Franck Condon Region erklärt.[78] Hierbei werden verschiedene Pfade für die Relaxation in den S_0 angenommen. Für KR2 wurde erstmals ein Modell vorgeschlagen, welches eine Inhomogenität des Ausgangsgrundzustandes als Grund für den reaktiven und nicht reaktiven S_1 Zustand hat. Hier soll das Vorhandensein beziehungsweise Fehlen einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Gegenion D116 und der protonierten Retinal Schiffbase (PRSB) für den jeweils reaktiven oder nicht reaktiven S_1 Zustand verantwortlich sein. Weiterhin konnte eine Salzabhängigkeit des angeregten Zustands festgestellt werden. Abbildung 5.6 zeigt die Transienten bei 477 nm bei den verschiedenen Salzbedingungen.

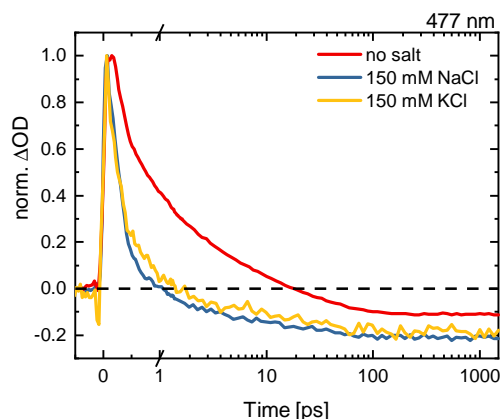


Abbildung 5.6: Normierte transiente Absorptionsänderungen bei 477 nm der Ultrakurzzeitmessungen von KR2 WT bei verschiedenen Salzbedingungen.

Wie schon zuvor in den LDMs gesehen zeigt KR2 ohne Salz den langsamsten Zerfall des angeregten Zustandes, während die Zerfälle von KR2 mit NaCl und KCl ähnlich schnelle Zeiten aufweisen. Die in der Lösung vorhandenen Ionen müssen also entweder über spezifische (extrazelluläre Bindestelle) oder unspezifische Bindung an das Protein dessen Struktur und/oder Funktion derart beeinflussen, dass ein schnelleres Verlassen des angeregten Zustandes möglich ist. Der gleiche Effekt konnte auch für die Mutante H30A (Unterabschnitt 5.2.2) nachgewiesen werden. Ob K^+ nun an die extrazelluläre Bindestelle binden kann, ist noch nicht eindeutig geklärt. ATR-FTIR Messungen ergaben Differenzspektren bei Salzaustausch zwischen NaCl und KCl, was jedoch nicht ausschließt, dass K^+ nicht an die Bindestelle binden kann, sondern lediglich zeigt, dass das Protein in einer leicht anderen Weise von dem Ion beeinflusst wird. Die Besetzung dieser extrazellulären Bindestelle hat über weitreichende Wechselwirkungen wahrscheinlich Einfluss auf den Abstand zwischen Retinal Schiffbase und Gegenion und damit auch direkt auf den Photozyklus. Mit Hilfe von zeitaufgelöster Raman Spektroskopie konnte hauptsächlich ein Einfluss auf das K/L Gleichgewicht beobachtet werden. [72] Generell jedoch reagiert KR2 sehr sensitiv auf seine chemische Umgebung, so ändert sich der Photozyklus zum Teil drastisch, je nachdem ob KR2 rekonstituiert oder solubilisiert vorliegt. [79] Auf das umgebungssensitive Verhalten von KR2 wird näher in Abschnitt 5.3 eingegangen.

5.2.2 H30A

Die Aminosäure H30 (Abbildung 5.1) befindet sich in der Transmembranhelix A. Sie sitzt am Interface zweier Protomere im Pentamer und zeigt zu den Transmembranhelices C' und D' des nächsten Protomers. NMR Studien konnten einen langreichweitigen Einfluss dieser Aminosäure auf die Konformation der Retinalbindetasche des nächsten Protomers nachweisen. Im Gegensatz zu der Retinalbindetasche des eigenen Protomers, welche 20 Å entfernt ist, ist die Bindetasche des nächstgelegenen Protomers nur 15 Å entfernt. [80] Mit der H30A Mutation ändert sich die chemische Verschiebung des ^{15}N der PRSB um 5,6 ppm. Das Absorptionsspektrum der Mutante ändert sich bei einem pH Wert in Nähe des pK_s Wertes des Gegenions D116 jedoch nicht.

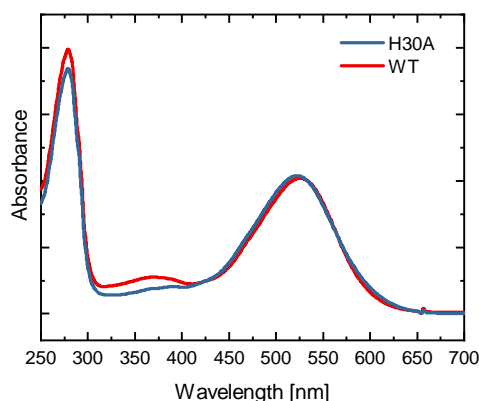


Abbildung 5.7: Absorptionsspektren des KR2 WT und der H30A Mutante bei pH 8,5.

Auch bei dem für die Messungen verwendeten pH Wert von 8,5 verschiebt sich das Absorptionsspektrum nur um wenige Nanometer, verglichen mit dem Wildtyp. Eine weitere Eigenschaft der H30A Mutation ist die Konvertierung des Proteins zu einer fast ausschließlichen Na^+ -Pumpe [36], die nur noch wenige Protonen transportieren kann. Außerdem können Na^+ -Ionen im Grundzustand nicht mehr an die extrazelluläre Bindestelle gebunden werden. [80] Aufgrund der großen Änderung der chemischen Verschiebung der PRSB sowie dem Wegfallen der extrazellulären Bindestelle wurde die Ultrakurzzeitdynamik untersucht. Um einen guten Vergleich zum Wildtyp ziehen zu können, wurden die selben experimentellen Bedingungen, wie in Unterabschnitt 5.2.1, für die Probenpräparation sowie die Ultrakurzzeitanlage ge-

wählt. Generell beinhaltet die Ultrakurzzeitmessung der H30A Mutante die selben Eigenschaften wie der Wildtyp.

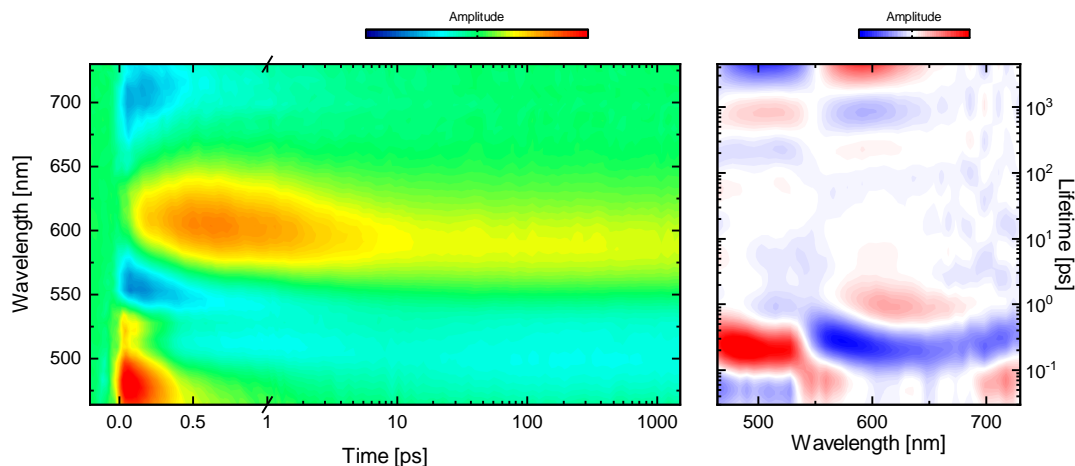


Abbildung 5.8: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) der KR2 Mutante H30A mit 150 mM NaCl bei pH 8,5.

Für die Messung mit NaCl als Salz (Abbildung 5.8) findet man die ESA im Bereich von 460 - 530 nm. Bei der H30A-Mutante ist jedoch die Doppelbandenstruktur der ESA, mit den beiden Maxima bei 490 und 520 nm, deutlicher zu erkennen. Zwischen 520 und ca. 600 nm befindet sich das Grundzustandsbleichen, welches sich mit dem Zerfall der ESA und dem Aufbau des J Intermediates, zu späteren Zeiten, ins Blaue verschiebt. Zur gleichen Zeit wie die ESA ist auch die stimulierte Emission oberhalb von 650 nm deutlich sichtbar. Mit dem Zerfall der ESA, welche eine Lebenszeitverteilung von 100 bis 500 fs hat, bildet sich das J Intermediat, welches spektral zwischen 560 und 660 nm gelegen ist. Durch Schwingungsrelaxation bildet sich mit 1,2 ps aus dem J das K Intermediat, welches ca. 30 nm ins Blaue verschoben ist. Dieses, sowie das Grundzustandsbleichen, bleibt bis zum Ende der Messung bei 1,5 ns bestehen. Die photoinduzierte Dynamik der H30A-Mutante ohne Salz ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Bei dieser sind die spektralen Lagen der Intermediate gleich zu der Messung mit NaCl, lediglich der zeitliche Ablauf, sowie die Amplituden der Intermediate ändern sich. Wie schon beim Wildtyp verlangsamt sich auch bei der H30A Mutante der Zerfall des angeregten Zustands der salzfreien Messung deutlich. Die Lebenszeitverteilung der schnellen Komponente erstreckt sich hier von ca. 100 fs bis hin zu 1,1 ps während die langsamere Komponente mit einer Lebenszeitverteilung um 20 ps

zerfällt.

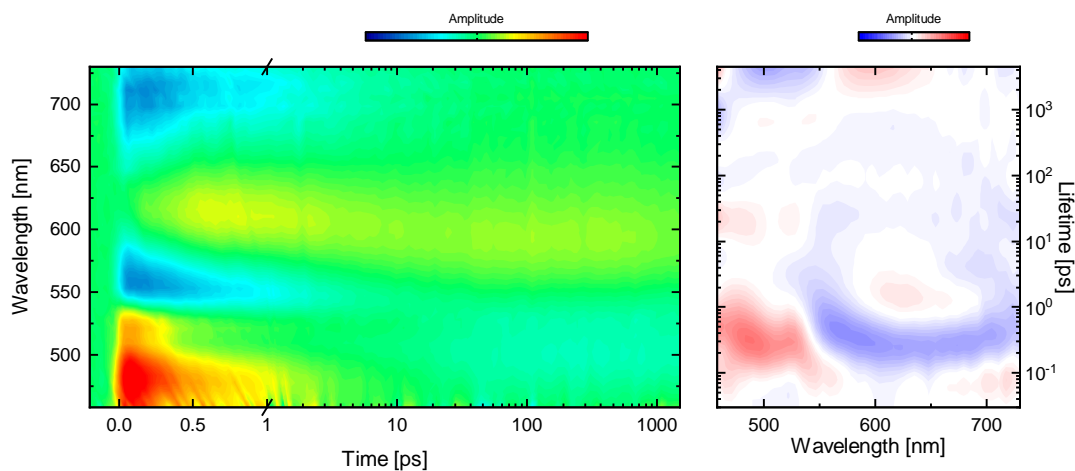


Abbildung 5.9: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) der KR2 Mutante H30A ohne Salz bei pH 8,5.

Auch das J Intermediat, welches sich mit der schnelleren Zerfallskomponente der ESA aufbaut, zerfällt etwas langsamer als in der Messung mit NaCl. Auch hier bleibt das zuletzt gebildete K Intermediat bis zum Ende der Messung bestehen. Generell sind für die Messungen mit und ohne NaCl die gleichen Trends erkennbar wie für den Wildtyp des Proteins: Durch das Weglassen des Salzes wird die zweite Komponente des biphasischen ESA Zerfalls langsamer und stärker populiert.

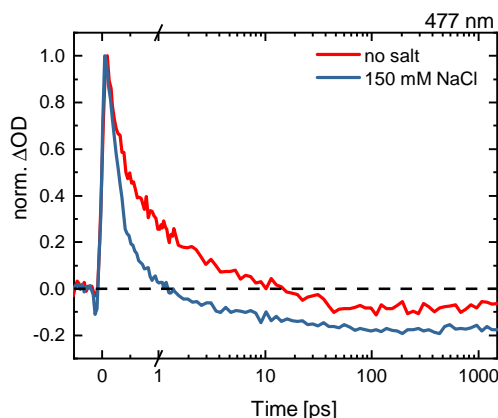


Abbildung 5.10: Normierte transiente Absorptionsänderungen bei 477 nm der Ultrakurzzeitmessungen der KR2 H30A Mutante mit und ohne NaCl.

Dieses Verhalten wird in Abbildung 5.10, wie auch in Abbildung 5.6 für den Wildtyp, verdeutlicht. Das gleiche Verhalten spiegelt sich ebenfalls in der stimulieren

Emission wieder. Durch den langsameren ESA Zerfall wird das J Intermediat langsamer gebildet und zerfällt auch zu einem späteren Zeitpunkt. Nach 1,5 ns, am Ende der Messung, ist jedoch bei allen Bedingungen das K Intermediat gebildet und das Protein läuft weiter in den Photozyklus.

5.2.3 L120Q

Die Aminosäure L120 ist in Transmembranhelix C des Proteins angesiedelt. Es wird vermutet, dass diese Aminosäure als hydrophobes Tor zwischen der cytoplasmatischen und der extrazellulären Seite fungiert.[69, 81] Moleküldynamik-Simulationen konnten zeigen, dass L120 im K Intermediat weiter von der Schiffbase entfernt ist und somit den Zugang für Wassermoleküle zur Schiffbase freigibt. Im M Intermediat ist L120 in der Ausgangsposition zurück und schließt so den Zugang.[81] Ein ähnliches Konzept wurde bereits 2004 für das homologe L93 in BR vorgeschlagen.[82]

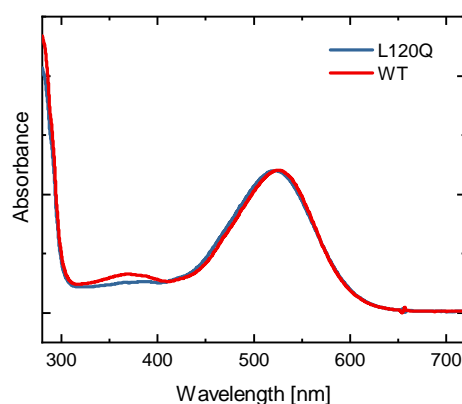


Abbildung 5.11: Absorptionsspektren des KR2 WT und der L120Q Mutante bei pH 8,5.

Obwohl die Mutation von L nach Q mit dem Glutamat eine geladene Gruppe in der Nähe der Schiffbase einführt, ändert sich am Absorptionsspektrum, welches in Abbildung 5.11 gezeigt ist, nur sehr wenig ($\Delta\lambda_{max} = 4$ nm) im Vergleich zum Wildtyp. Auch die Breite des Retinalpeaks ändert sich nicht. Die Probe wurde von Dr. Jagdeep Kaur aus dem Arbeitskreis von Prof. Glaubitz bereitgestellt. Der wässrige Puffer enthielt 50 mM TRIS, 0,1% DDM sowie 150 mM NaCl, der pH Wert wurde auf 8,5 eingestellt.

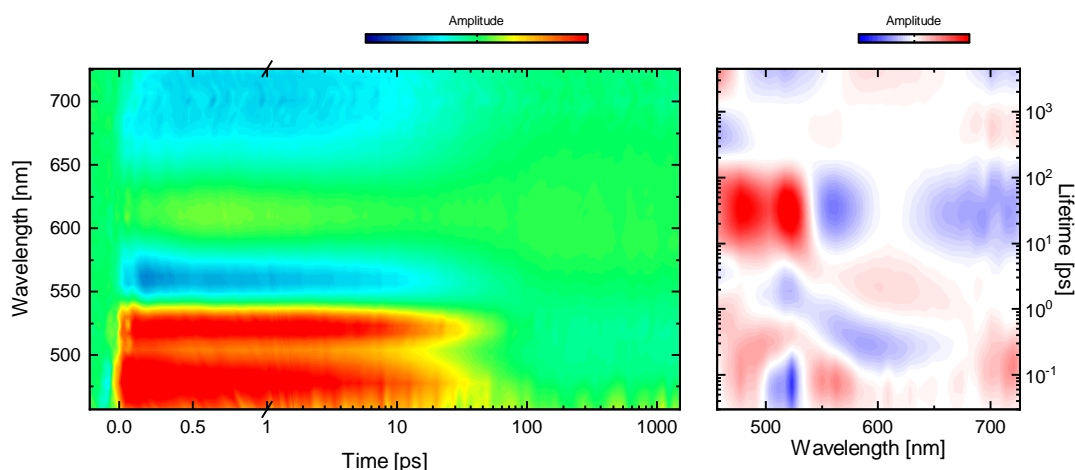


Abbildung 5.12: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) der KR2 Mutante L120Q mit 150 mM NaCl bei pH 8,5.

Für die Ultrakurzzeitmessung wurde die Probe mit Licht einer Wellenlänge von ca. 525 nm mit einer Energie von 60 nJ/Puls angeregt. Die Messung ist in ?? gezeigt. Hier ist die ESA Doppelbandenstruktur, mit einer Bande von < 460 - 504 nm und der zweiten Bande von 504 - 543 nm, deutlich erkennbar. Auch ist sichtbar, dass der Zerfall der ESA viel langsamer ist als im Wildtyp. Der Zerfall der ESA ist biphasisch mit einer schnellen Komponente (ca. 200 fs) und einer deutlich stärker ausgeprägten langsameren Komponente mit einer Lebensdichteverteilung deren Maximum bei ca. 35 ps liegt.

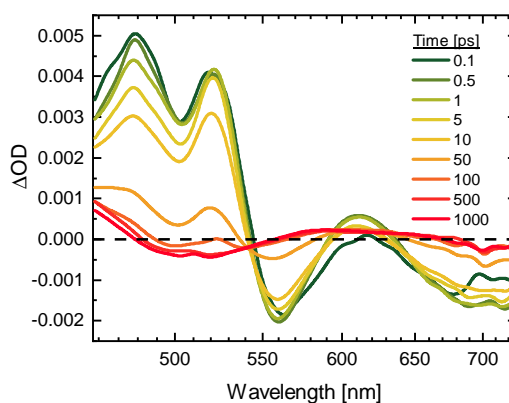


Abbildung 5.13: Zeitschnitte der Ultrakurzzeitmessung der KR2 Mutante L120Q und 150 mM NaCl bei pH 8,5.

Auch hier populierte der schnelle Zerfall schwach das J Intermediat, welches unter

einer Blauverschiebung in das K Intermediat übergeht. Der langsame Zerfall führt in den nicht reaktiven Pfad und somit nicht zu einem Photozyklusprodukt. Aufgrund des starken Beitrags des langsameren Zerfalls ist die Quantenausbeute für den Photozyklus geringer als für den Wildtyp, leider lassen sich aus den Messungen, aufgrund der Überlagerungen der Signale, keine direkten Werte für die Ausbeute berechnen. Der Bereich > 650 nm zeigt die stimulierte Emission, welche ebenfalls mit der gleichen Zeit wie die langsame ESA Komponente (ca. 35 ps) zerfällt. Am Ende der Messung (Abbildung 5.13) bleibt ein Restsignal des Grundzustandsbleichens, sowie des K Intermediats übrig, auch wenn diese, im Vergleich zur ESA, nur eine sehr geringe Amplitude haben.

5.2.4 A2 Retinal

Das 3,4-dehydroretinal, kurz A2 Retinal, ist ein Retinalanalogon welches ein erweitertes π -System, im Vergleich zum normalen Retinal, besitzt. Die Erweiterung bezieht sich auf eine zusätzliche Doppelbindung zwischen Position 3 und 4 im β -Jonon Ring, dargestellt in Abbildung 5.14. In der Vergangenheit wurde dieses Analogon bereits in archealen Rhodopsinen [83, 84], sowie auch Xanthorhodopsin [85] eingesetzt, um eine Rotverschiebung des Absorptionsspektrums zu induzieren.

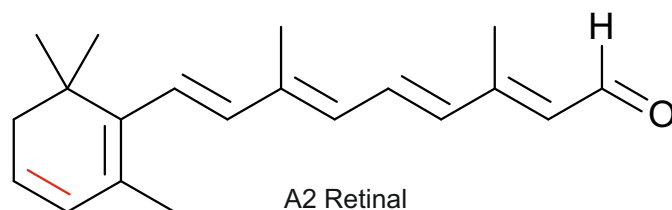


Abbildung 5.14: Struktur des A2 Retinals. Unterschiede zum normalen Retinal in rot markiert.

Auch in KR2 wird durch den Austausch des Retinal Chromophors mit dem A2 Retinal eine Rotverschiebung um ca. 28 nm zu 554 nm im Absorptionsspektrum herbeigeführt (Abbildung 5.15). Langwellige Absorption ist eine oft gewünschte Eigenschaft von Retinalproteinen, welche oft auch als optogenetische Werkzeuge verwendet werden. Für die biologische Anwendung wird hier die Penetrationstiefe des

Anregungslichts erhöht, sowie die Streuung an Gewebe und die Absorption an Hämoglobin verringert.

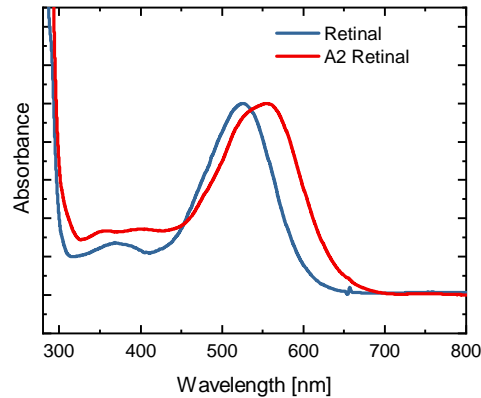


Abbildung 5.15: Absorptionsspektrum des A2 Retinals im Vergleich zu normalem Retinal, eingebaut in KR2.

Um den Einfluss des A2 Retinals auf die Dynamik des Proteins zu untersuchen, wurden Ultrakurzzeitmessungen unter verschiedenen Bedingungen (mit und ohne NaCl) durchgeführt. Hierfür wurde die Probe von Dr. Jagdeep Kaur aus dem Arbeitskreis von Prof. Glaubitz bereitgestellt. Der wässrige Puffer enthielt 50 mM TRIS, 0,1% DDM sowie 100 mM NaCl oder kein Salz. Der pH Wert wurde mit TRIS-Cl auf 8,5 eingestellt. Für die Ultrakurzzeitmessung wurde das Anregungslicht auf eine Zentralwellenlänge von 555 nm und eine Energie von ca. 2,5 mJ/Puls eingestellt. Die Messung mit 100 mM NaCl ist in Abbildung 5.16 gezeigt. Im Femtosekundenbereich fällt zuerst eine sehr breite ESA (450 - 690 nm) auf, deren Anteil < 575 nm jedoch nur schwach sichtbar ist, da hier Kompensation mit dem Grundzustandsbleichen vorliegt. Aus der LDM kann man sehen, dass auch stimulierte Emission vorliegt, deren Maximum wahrscheinlich um 600 nm liegt. Im 100 - 500 fs Bereich verschieben sich ESA und SE, wobei die ESA hypsochrom und die SE bathochrom schiebt. Dies lässt sich besonders gut an der alternierenden Amplitudensignatur in der LDM erkennen. Die schnelle Komponente ESA zerfällt mit ca. 550 fs und bildet, geht man vom Mechanismus des Wildtyps aus, ein rotverschobenes J ähnliches Intermediat im Bereich > 600 nm, welches aber mit der noch vorhandenen langsameren Komponente der ESA überlagert und deswegen nur schwer sichtbar ist.

Das J ähnliche Intermediat zerfällt im Bereich von 1 bis 10 ps mit einer Blauverschie-

5.2. PRIMÄRREAKTION DES KR2

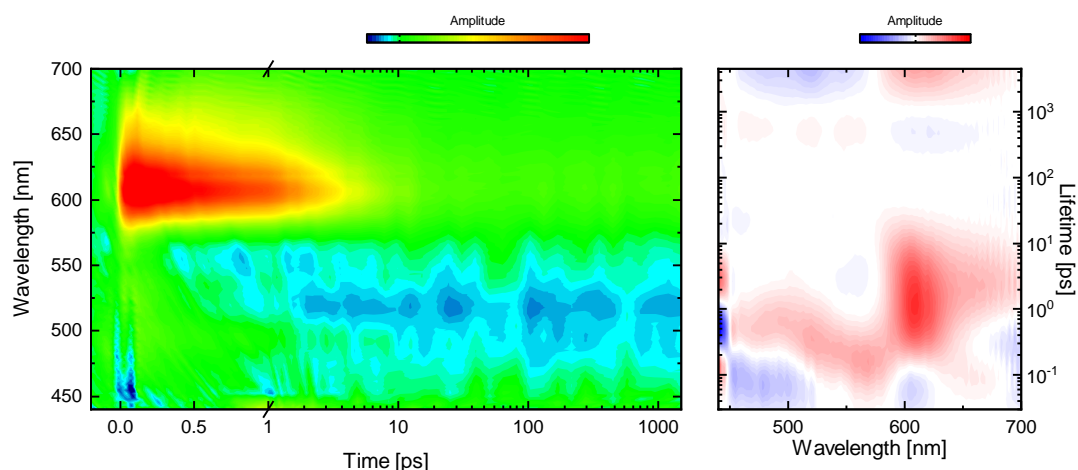


Abbildung 5.16: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) von KR2 mit A2 Retinal und 100 mM NaCl bei pH 8,5.

bung und bildet ein K ähnliches Intermediat, welches bis zum Ende der Messung bestehen bleibt. Aufgrund der Überlagerung des J ähnlichen Intermediates und der langsameren Komponente der ESA lässt sich die langsamere Zerfallszeit leider nicht genau bestimmen. Die geringe Amplitude des am Ende verbleibenden Signals lässt auch hier vermuten, dass ein großer Teil der angeregten Moleküle den nicht-reaktiven Pfad beschreitet und nicht in den Photozyklus übergeht.

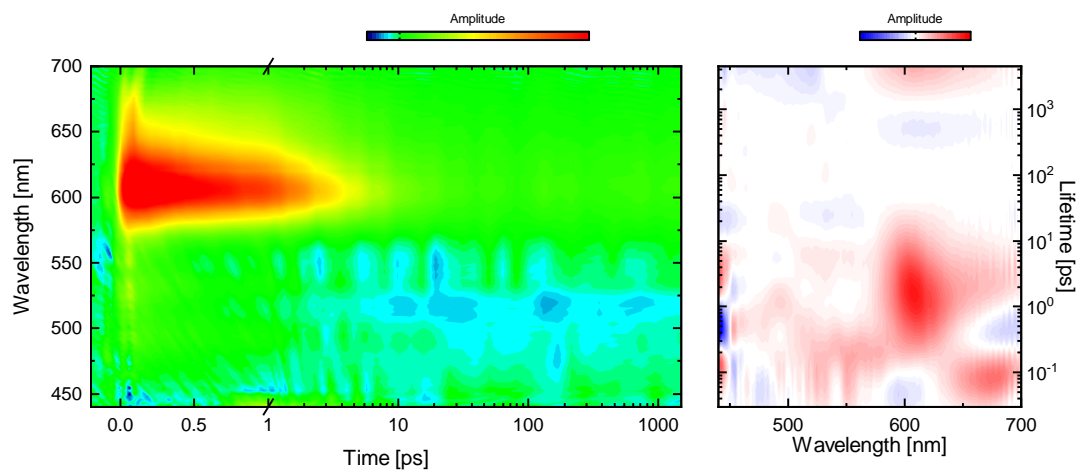


Abbildung 5.17: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) von KR2 mit A2 Retinal ohne Salz bei pH 8,5.

Abbildung 5.17 zeigt die gleiche Messung, jedoch ohne NaCl. Hier laufen die gleichen Prozesse ab, wie in der Messung mit NaCl. Überraschenderweise sind diese auch

auf der gleichen Zeitskala angesiedelt, was einen großen Unterschied zum Wildtyp darstellt. Die Einführung der extra Doppelbindung im β -Jonon Ring scheint die Struktur des Proteins dahingehend zu beeinflussen, dass es zumindest auf der Ultrakurzzeitskala unsensitiv gegenüber den in der Lösung vorhandenen Kationen ist. Trotz der Rotverschiebung des Absorptionsspektrums und der damit einhergehenden geringeren Anregungsenergie läuft trotzdem eine Primärreaktion ab, die ähnliche Eigenschaften zum Wildtyp besitzt, deren Quantenausbeute für die Photoreaktion jedoch geringer ist.

5.2.5 MMARetinal

3-methylamino-16-nor-1,2,3,4-didehydroretinal, kurz MMAR, ist ein Retinalanalogon welches ebenfalls ein erweitertes π -System, verglichen mit dem normalen Retinal, besitzt.

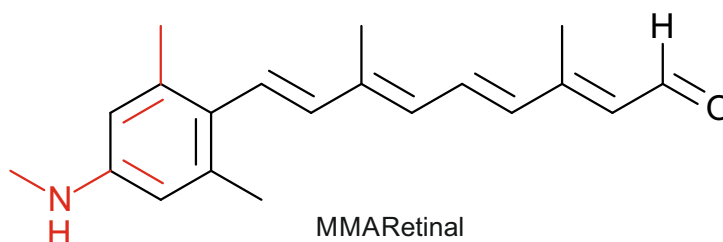


Abbildung 5.18: Struktur des MMAR Retinals. Unterschiede zum normalen Retinal in rot markiert.

Die Struktur ist in Abbildung 5.18 dargestellt. Die Unterschiede beinhalten hauptsächlich die volle Konjugation des π -Systems des β -Jonon Rings, sowie die Methylamino-Funktion an der 3 Position des Ringes. Durch die Konjugation des Ringes fehlt natürlich die zweite Methylgruppe an der 1 Position im Ring. Dieses Retinalanalogon kann benutzt werden, um das Absorptionsspektrum des jeweiligen Retinalproteins bathochrom zu verschieben. Diese bathochrome Verschiebung wurde bereits durch einen erfolgreichen Einbau in PR beobachtet.[86] Auch in KR2 verursacht der Einbau dieses Retinals eine Rotverschiebung des Absorptionsspektrums. Das Spektrum schiebt um ca. 55 nm ins Rote, so dass das Absorptionsmaximum bei 580 nm zu finden ist, wie in Abbildung 5.19 zu sehen ist.

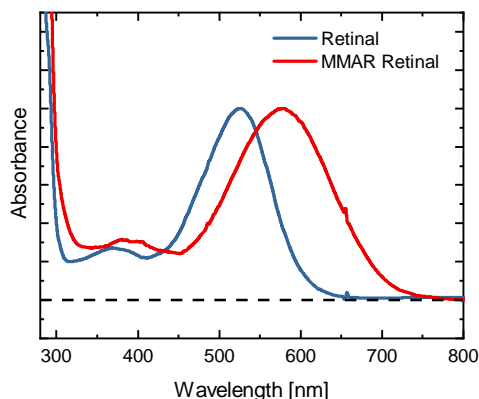


Abbildung 5.19: Absorptionsspektrum des MMAR im Vergleich zu normalem Retinal, eingebaut in KR2.

Die Probe wurde von Dr. Jagdeep Kaur aus dem Arbeitskreis von Prof. Glaubitz bereitgestellt. Der wässrige Puffer enthielt 50 mM TRIS, 0,1% DDM sowie 100 mM NaCl oder kein Salz. Der pH Wert wurde auf einen Wert von 8,5 eingestellt. Die Proben wurden mit Licht einer Wellenlänge von ca. 575 nm mit einer Energie von 60 nJ/Puls angeregt. Abbildung 5.20 zeigt die Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit eingebautem MMAR und 100 mM NaCl, sowie die dazugehörige LDM. Auf den ersten Blick ist direkt sichtbar, dass sich die Ultrakurzzeitdynamik fundamental von der des Wildtyps unterscheidet.

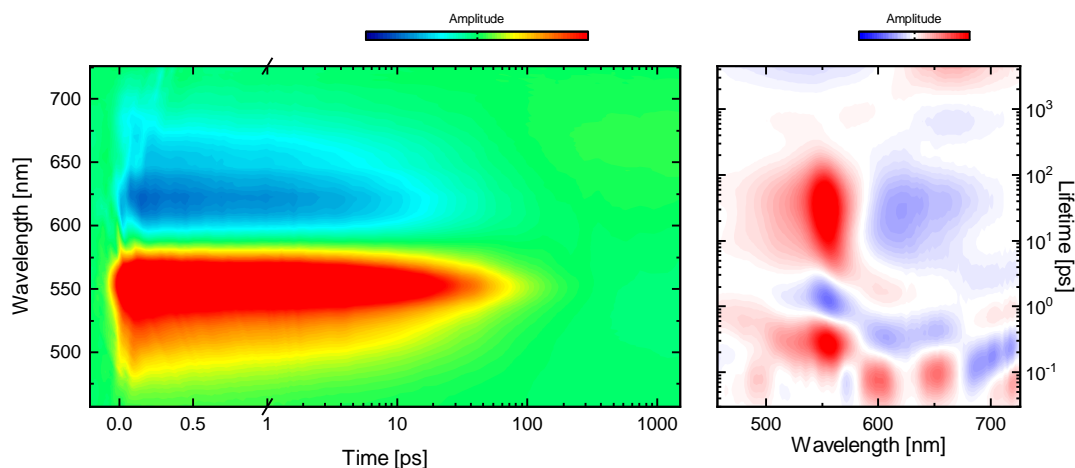


Abbildung 5.20: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) von KR2 mit MMAR und 100 mM NaCl bei pH 8,5.

Zu Beginn der Messung sind zwei prominente Signale sichtbar, das Grundzustands-

bleichen welches sich von 588 bis ca. 720 nm erstreckt und die Absorption des angeregten Zustandes welche von < 450 bis hin zu 588 nm zu sehen ist. Diese Signale zerfallen beide biphasisch und wechseln anschließend die Vorzeichen der Amplituden, um das erste K ähnliche Photointermediat zu bilden, welches bis zum Ende der Messung bestehen bleibt. Aufgrund der Kontamination mit dem kohärenten Artefakt ist es schwierig über die sehr frühen Zeiten eine Aussage zu treffen. Der erste Zerfall des angeregten Zustands hat eine Lebenszeit um 300 fs. Anschließend kann in der LDM eine Verschiebung beobachtet werden, welche in einem Zeitbereich von 4 - 300 ps langsam das Photoprodukt, welches sich spektral von ca. 588 - 730 nm erstreckt, aufbaut.

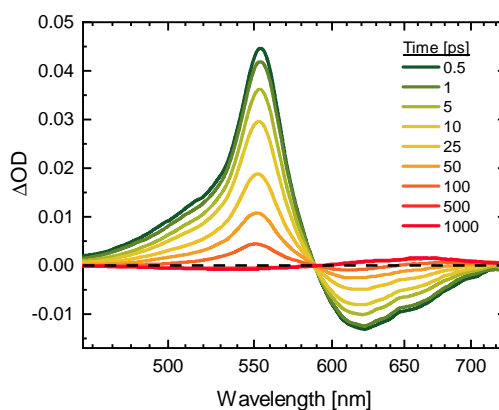


Abbildung 5.21: Zeitschnitte der Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit MMAR und 100 mM NaCl bei pH 8,5.

Gleichzeitig mit dem Aufbau des Photoprodukts wird das Grundzustandsbleichen spektral, durch Kompensation mit dem Photoprodukt und dem Wegfallen des angeregten Zustandes, zu Wellenlängen < 588 nm geschoben. Die Zeitschnitte, welche in Abbildung 5.21 dargestellt sind, zeigen sehr gut den Vorzeichenwechsel um den isosbestischen Punkt bei 588 nm. Die hier beschriebene Dynamik scheint das im Wildtyp vorhandene J Intermediat zu umgehen und direkt aus dem angeregten Zustand das K ähnliche Photoprodukt, wenn auch nur mit geringer Quantenausbeute zu bilden. Die Ultrakurzzeitmessung ohne Salz in Abbildung 5.22 zeigen im Wesentlichen die gleiche Dynamik, wie bei der Messung mit NaCl, vor. Auch hier hat man unterhalb von 588 nm eine biphasisch zerfallende ESA und oberhalb des isosbestischen Punktes das Grundzustandsbleichen. Anschließend wird, wie auch schon bei der Messung

5.2. PRIMÄRREAKTION DES KR2

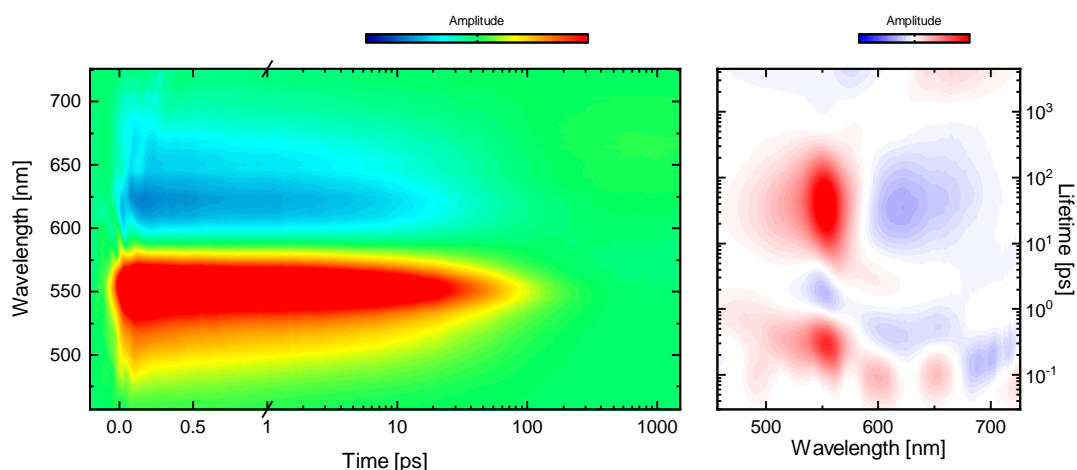


Abbildung 5.22: Ultrakurzzeitmessung (links) und zugehörige LDM (rechts) von KR2 mit MMAR ohne Salz bei pH 8,5.

mit NaCl, im Pikosekundenbereich über eine Verschiebung von ESA und Grundzustandsbleichen das Photoprodukt gebildet. Hierbei wechseln die Vorzeichen der Signale, wo zuvor das Grundzustandsbleichen war kommt ein positives Signal des Photoprodukts und das positive Signal der ESA wechselt zum negativen Signal des Grundzustandsbleichens. Das gebildete Photoprodukt bleibt dann bis zum Ende der Messung bestehen.

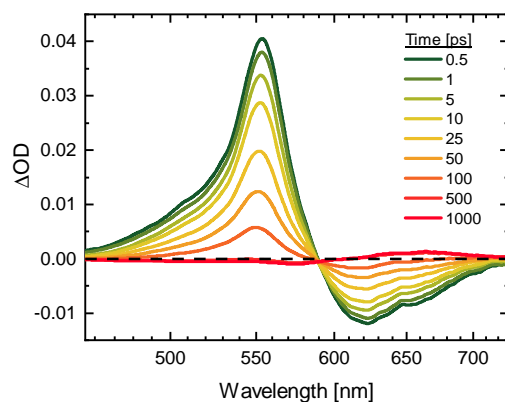


Abbildung 5.23: Zeitschnitte der der Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit MMAR ohne Salz bei pH 8,5.

Für einen besseren Vergleich der photoinduzierten Ultrakurzzeitdynamik mit und ohne Salz sind auch hier in Abbildung 5.23 die Zeitschnitte der salzfreien Messung dargestellt. Diese sind im wesentlichen mit den Zeitschnitten der NaCl Messung

identisch. Wie auch schon beim A2 Retinal zu beobachten war, spielt auch beim MMAR die Anwesenheit von Salz, im Gegensatz zum Wildtyp, keine große Rolle für die Kurzzeitdynamik. Auch hier wären für eine weitere Untersuchung des Systems strukturelle und funktionelle Studien wichtig, wobei für das MMAR aufgrund der geringen Isomerisierungsausbeute höchstwahrscheinlich nicht all zu viel Pumpaktivität zu erwarten ist.

5.2.6 Zusammenfassung & Diskussion

Die in Abschnitt 5.2 gezeigten Messungen und Ergebnisse sollten eine Übersicht über das Ultrakurzzeitverhalten von KR2 bei bestimmten Bedingungen vermitteln. Generell deckt sich das Reaktionsschema des Wildtyps grundlegend mit der Literatur. [71, 72, 74]

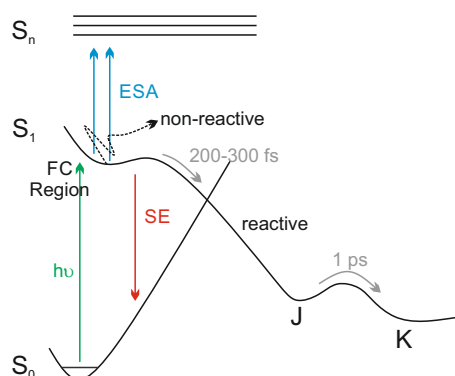


Abbildung 5.24: Schematische Illustration der primären Photoreaktion des KR2 Wildtyps. Zeiten beziehen sich auf die Messung mit NaCl.

Nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge landen die angeregten Moleküle im S_1 Zustand. Von hier aus gibt es den reaktiven und nicht-reaktiven Reaktionspfad für die angeregten Moleküle. Normalerweise werden diese Pfade durch eine Verzweigung nach Verlassen der Franck-Condon Region beschriftet. Der schnellere Pfad führt zur Isomerisierung des Chromophors, während hingegen der andere, langsamere Pfad, ohne Isomerisierung zurück in den Grundzustand führt. [71] Für KR2 gibt es jedoch noch ein alternatives Modell, bei dem die verschiedenen Reaktionspfade auf eine Inhomogenität, nämlich das Vorhandensein oder Fehlen der Wasserstoffbrücke zwi-

schen PRSB und Gegenion, zurückzuführen ist. [74] Unabhängig vom Mechanismus führt der schnelle Pfad zur Isomerisierung des Retinals und bildet ein heißes Grundzustandsintermediat, welches mit J gekennzeichnet ist. Über Kühlprozesse gelangt man hier innerhalb weniger Pikosekunden zum K Intermediat, welches das letzte Intermediat auf der Ultrakurzzeitskala ist. Der langsamere Pfad führt, wie bereits erwähnt, nicht zur Isomerisierung, sondern zur Rückkehr in den Grundzustand. In Gegenwart von NaCl sowie KCl sind diese Prozesse ähnlich schnell, in Abwesenheit der Ionen jedoch um ca. einen Faktor 50-100 langsamer. Dies bedeutet, dass die Anwesenheit der Ionen eine wichtige Rolle schon für die Ultrakurzzeitdynamik spielt. Die ersten KR2 Kristallstrukturen konnten bereits zeigen, dass das Protein eine extrazelluläre Bindestelle für Na⁺-Ionen am Interface der Protomere besitzt. [48, 69] ATR-FTIR Ionen-Austausch Experimente mit NaCl, KCl, RbCl sowie CsCl lieferten Hinweise, dass auch K⁺ zumindest teilweise gebunden werden kann, während Rb⁺ und Cs⁺ nicht gebunden werden. Des Weiteren hat die Besetzung der extrazellulären Bindestelle einen Einfluss auf die Struktur der Retinal-Bindetasche. [87] Mit Hilfe der D102N Mutation, welche zwar die Bindung von Na⁺-Ionen an die extrazelluläre Bindestelle, jedoch nicht den Na⁺ Transport verhindert, wurden von Hontani *et al.* Ultrakurzzeit-Untersuchungen durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass nicht der angeregte Zustand, jedoch die spätere Pikosekundendynamik des Proteins, durch den Wegfall der Na⁺ Bindung, beeinflusst werden kann. [72] Die Anwesenheit von Ionen scheint also auch, unabhängig von der Besetzung der extrazellulären Bindestelle, eine wichtige Rolle für die Funktion, z.B. durch die korrekte Faltung, des Proteins zu spielen. Für die H30A Mutation konnte der gleiche Trend festgestellt werden. Auch hier verlangsamt sich die Primärreaktion in Abwesenheit von Salz.

Betrachtet man die Kurzzeitdynamik der L120Q Mutante, so stellt man fest, dass der nicht-reaktive Pfad viel langsamer wird, aber dafür stärker populiert ist, als im Wildtyp. Dies ist interessant, da die Aminosäure L120 am hydrophoben Gate sitzt [69] und durch Bewegung während des Photzyklus die Zugänglichkeit für Wasser zur protonierten Schiffbase freigibt. [81] Durch die Mutation von Leucin zu Glutamin wird eine zusätzliche Amidgruppe eingeführt, welche höchstwahrscheinlich das Wasserstoffbrückennetzwerk stören kann und damit einen Einfluss auf das

Gegenion D116 hat, da diese über Wasserstoff-Brücken miteinander verbunden sind. Aufgrund der Störung kann sich die Umgebung der Retinalbindetasche ändern, was zur Bevorzugung des nicht-reaktiven Pfades führen kann. Interessanterweise wirkt sich diese Störung jedoch kaum auf das Grundzustandsspektrum aus, da dieses nur um ca. 4 nm verschoben ist. Einen größeren Effekt auf das Grundzustandsspektrum bekommt man durch die Einführung der Retinalanaloge A2 Retinal und MMAR. Beide weisen ein erweitertes π -System auf, wobei das A2 Retinal um eine weitere Doppelbindung im β -Jonon Ring und das MMAR um zwei Doppelbindungen im Ring, sowie eine weitere Methylamino-Gruppe, erweitert ist. Durch die größere Erweiterung zeigt das MMAR auch die größere Rotverschiebung von ca. 50 nm, während hingegen das A2 Retinal um ca. 30 nm ins Rote schiebt. Beide Retinalanaloge haben sehr breite ESA Spektren, wobei die ESA für das A2 Retinal etwas bathochrom zum Grundzustand verschoben ist und die ESA für das MMAR eher hypsochrom zum Grundzustand. Beide Proteine isomerisieren nur zu einem geringen Teil, der Hauptteil der angeregten Moleküle geht über den nicht-reaktiven Pfad zurück in den unisomerisierten Grundzustand. Leider gibt es noch keine Funktionsstudien zu diesen Analoga, sodass noch unklar ist, ob überhaupt Ionen transportiert werden können. Aufgrund der geringen Isomerisierungsrate würden die Transportströme wahrscheinlich um einiges geringer ausfallen, als für den Wildtyp. Auch die Oligomerisierung sowie die Konformation der einzelnen Oligomere ist wichtig für die Funktion des Proteins. Kovalev *et al.* konnten in ihren Strukturstudien am Wildtyp zeigen, dass die Oligomerisierung als Pentamer eine wichtige Rolle für die biologische Funktion des Proteins spielt. [70] Liegt KR2 als Monomer vor, ist das Protein 70° zur Membranebene gekippt, während das Pentamer senkrecht zur Membranebene in die Membran eingebaut ist. Dies hat zur Folge, dass die Region, in der die Ionen aufgenommen werden, im Monomer im hydrophoben Teil der Membran verschwindet, während sie im Pentamer im hydrophilen Teil angeordnet ist. Auch die Konformation der RSB Umgebung, welche aus W113, S70, D116, D251, N112, R109 und L74 besteht, spielt eine wichtige Rolle. Je nach Position der Aminosäure N112 kann das Protein in der kompakten oder geweiteten Konformation existieren. Zweitens bietet Platz für drei Wassermoleküle zwischen D116 und D251. Die geweitete Konformation scheint ebenfalls ein bestimmender Faktor für die biologische

Funktion zu sein. Durch den Austausch von normalem Retinal zu A2 Retinal oder MMAR, was im Falle des MMAR sogar einen sterisch anspruchsvollen Rest mit sich bringt, können diese wichtigen Strukturen jedoch gestört werden, was sich ebenfalls negativ auf die biologische Funktion auswirken könnte.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ultrakurzzeitdynamik sehr sensitiv auf Änderungen der Optimalbedingungen reagiert. Die Abwesenheit von Salz, sowie bestimmte Mutationen oder die Substitution des Chromophors durch Analoga, verlängern die Verweildauer im angeregten Zustand und führen häufig zu einer höheren Population des nicht-reaktiven Pfades. Selbst wenn mit den jeweiligen Änderungen die biologische Funktion des Proteins erhalten bleibt, so wird schon auf der Ultrakurzzeit-Skala durch die geringere Isomerisierungsrate die Effizienz des Ionentransports verringert bzw. geschwächt.

5.3 Langzeitdynamik des KR2

Wie bereits in der Einführung erwähnt, besteht die Langzeitdynamik des KR2 aus den Signalbeiträgen der verschiedenen aufeinanderfolgenden Photointermediate K, L, M und O. In Abbildung 5.25 sind die jeweiligen Photozyklen für das Natrium- und Protonenpumpen in Detergenz gezeigt.

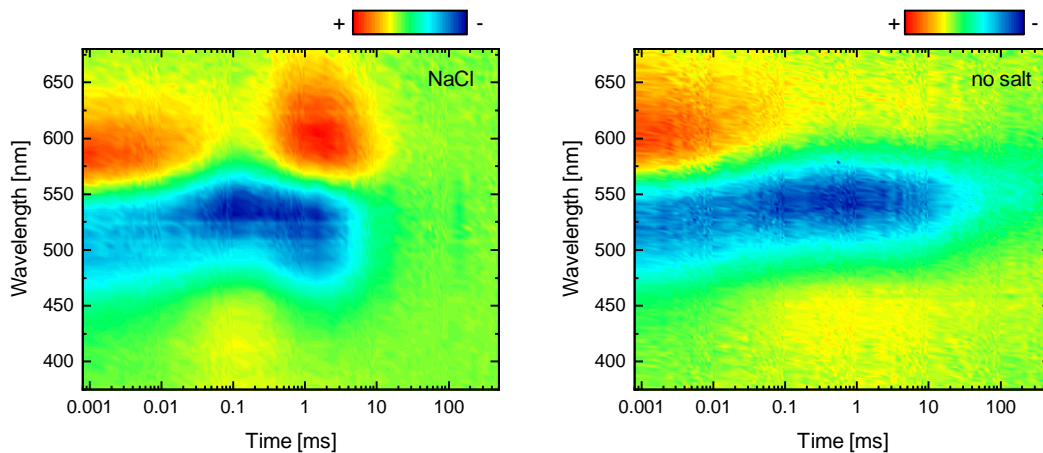


Abbildung 5.25: Blitzlichtphotolysemessung des KR2 Photozyklus mit und ohne 150 mM Natrium-Ionen bei pH 8.5 in Detergenz. Der Photozyklus ohne Natrium-Ionen ist in Detergenz erheblich länger als der Photozyklus mit Natrium-Ionen. Farbkodierung ist wie folgt: Blau markiert Bereiche mit negativer, grün mit keiner und rot mit positiver Absorptionsdifferenz.

Als K Intermediat wird das früheste rotverschobene Intermediat bezeichnet, welches sich in den Messungen oberhalb von 550 nm ansiedelt. Zeitlich gesehen befindet sich das K Intermediat im Mikrosekundenbereich, je nach Umgebungsbedingungen. Das M Intermediat ist blau verschoben und meist unterhalb von 525 nm zu sehen, es ist das Intermediat welches am weitesten blau verschoben ist. Ebenfalls, jedoch nur leicht blau verschoben und zeitlich zwischen dem K und M Intermediat gelegen, ist das L Intermediat. Dieses ist direkt aus der Messung am schwierigsten zu erkennen, da es spektral mit K, M und dem Grundzustand überlappt. Das letzte Intermediat (für den Na^+ -Pumpzyklus) ist das O Intermediat, es ist zeitlich nach dem M Intermediat zu finden und ist spektral rot zum Grundzustand verschoben.

Zwischen den beiden Photozyklen sind einige Unterschiede zu erkennen. Zuerst fällt auf, dass der Natrium-Pumpzyklus viel kürzer ist als der Protonen-Pumpzyklus.

Während der Na^+ Zyklus eine Photozykluszeit von 6 ms hat, zieht sich der H^+ Zyklus bis in den Sekundenbereich. Des weiteren fehlt dem H^+ Zyklus das O Intermediat, welches deswegen auch als spektraler Marker für den (nicht Protonen) Ionen-transport genutzt werden kann. [36]

Der Mechanismus für den Na^+ Transport ist bis jetzt noch nicht final geklärt, es gibt jedoch Hypothesen wie das modifizierte Panamakanal-Modell von Kandori *et al.* [88]: Hierbei isomerisiert das im Grundzustand vorgefundene all-*trans* Retinal während der Primärreaktion zum 13-*cis* Retinal und bildet über das J Intermediat das K Intermediat. Der Chromophor ist während des K Intermediats verzerrt, durch Relaxation (L Intermediat) kommt es zur Deprotonierung der Retinal Schiffbase durch das Gegenion D116 und es bildet sich das M Intermediat. Durch die Deprotonierung und das anschließende Wegklappen des protonierten D116 verliert diese Region ihre Ladung. Dies erlaubt die Natriumaufnahme auf der zytoplasmatischen Seite während des Übergangs von M nach O, hierbei wird auch die Wasserhülle des Natriums abgestreift und das Natrium-Ion in die Nähe der Schiffchen Base transportiert. Während des O Intermediates ist das Natrium-Ion wahrscheinlich an D251 gebunden, welches normalerweise im Grundzustand mit R109 wechselwirkt. Die Bindung des Natrium-Ions in der Schiffbasen Region bewirkt einen Rücktransfer des Protons von D116 zur Schiffchen Base, welches auch den Rücktransport des Ions verhindert. Anschließend öffnet sich die extrazelluläre Seite des Proteins für die Freisetzung des Natrium-Ions.

5.3.1 Verhalten bei verschiedenen pH- und Salzbedingungen

Interessant ist das Verhalten des Proteins gegenüber verschiedenen pH- und Salzbedingungen. Wie in Abschnitt 5.3 bereits gezeigt, unterscheiden sich die Photozyklen für den Protonen-Pump-Modus und den Natrium-Ionen-Pump-Modus deutlich voneinander. Eine kinetische Analyse der H^+ und Na^+ Selektivität von Kato *et al.* fand heraus, dass H^+ nur gepumpt wird, wenn die Na^+ und H^+ Konzentrationen ungefähr gleich sind ($k_H/k_{Na} > 10^3$). Unter physiologischen Bedingungen wird demnach nur Na^+ gepumpt, da die Konzentration an Na^+ -Ionen viel höher ist, als die an H^+ -Ionen. [89] Die Photozyklen bei pH 8.5 und verschiedenen Salzbedingungen sind

in Abbildung 5.26 dargestellt. Die Proben für die Messungen wurden von Janina Sörmann (AK Bamberg, MPI für Biophysik, Frankfurt) bereitgestellt. Das Protein wurde in einer inside-out Orientierung in Liposomen eingebaut, welche aus POPC, POPG und Cholesterol im Verhältnis 8:1:1 bestanden.

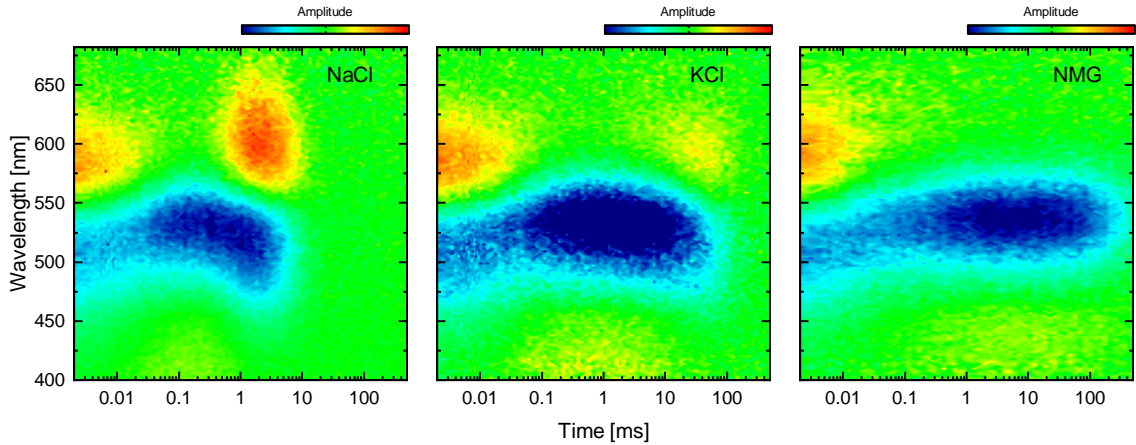


Abbildung 5.26: Blitzlichtphotolyse von KR2 bei pH 8.5 bei verschiedenen Salzbedingungen.

Der pH Wert wurde mit TRIS-Cl bzw. HCl eingestellt und 50 mM NaCl, KCl oder NMG (N-Methyl-D-glucamin) je nach Bedarf hinzugegeben. In diesen Messungen wurde NMG für den Protonen-Pump-Modus genutzt, da hier die Ionenstärke ähnlich gehalten werden sollte um die Vergleichbarkeit zu den elektrophysiologischen Messungen zu gewährleisten. NMG wird in der Elektrophysiologie als Ersatz für Natrium-Ionen genutzt, da es eine ähnliche osmotische Aktivität wie diese hat. Außerdem ist NMG zu groß, um durch KR2 transportiert zu werden.

Betrachtet man die Photozyklen bei pH 8.5, so fällt auf, dass die Photozyklusdauer von NaCl über KCl bis hin zu NMG immer länger wird. Zusätzlich wird auch die Amplitude des O Intermediats immer weniger, bis sie bei der NMG Messung gleich Null ist. Alle Datensätze konnten mit 4 Zeitkonstanten im Programm OPTIMUS gefittet werden, die Auflistung der Fitzeiten findet sich in Tabelle 5.1. Die Lebenszeiten sind den jeweiligen Übergängen zwischen den Intermediaten zugeordnet: τ_1 entspricht dem $K \rightarrow L$ Übergang, τ_2 entspricht dem $L \rightarrow M$ Übergang, τ_3 entspricht dem $M \rightarrow O$ Übergang und τ_4 entspricht dem Übergang von O in den Grundzustand. Für den Fall des Protonenpumpens kann kein O Intermediat gemessen werden, hier

liegt jedoch anstatt des O Intermediates meist ein Intermediat mit einer ähnlichen Absorption wie der Grundzustand vor. Aus Tabelle 5.1 ist ersichtlich, dass der K Zerfall für alle Messungen in einem ähnlichen Zeitrahmen (ca. 20 μs) passiert. Der größte zeitliche Unterschied bei pH 8.5 wird beim Zerfall des M Intermediates beobachtet, dieser verlängert sich von NaCl nach KCl um den Faktor 20 und von NaCl nach NMG um den Faktor 400. Die generelle Photozyklusdauer erhöht sich von 5.3 ms für NaCl auf 80 ms für KCl und >500 ms für die Messung mit NMG. Da laut Literatur keine K^+ -Ionen transportiert werden können ist ein Unterschied zwischen den Messungen in KCl und NMG unerwartet. Jedoch konnte schon in Abschnitt 5.2 gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Ionen auch eine wichtige Rolle für die Primärreaktion und deren Geschwindigkeit spielt.

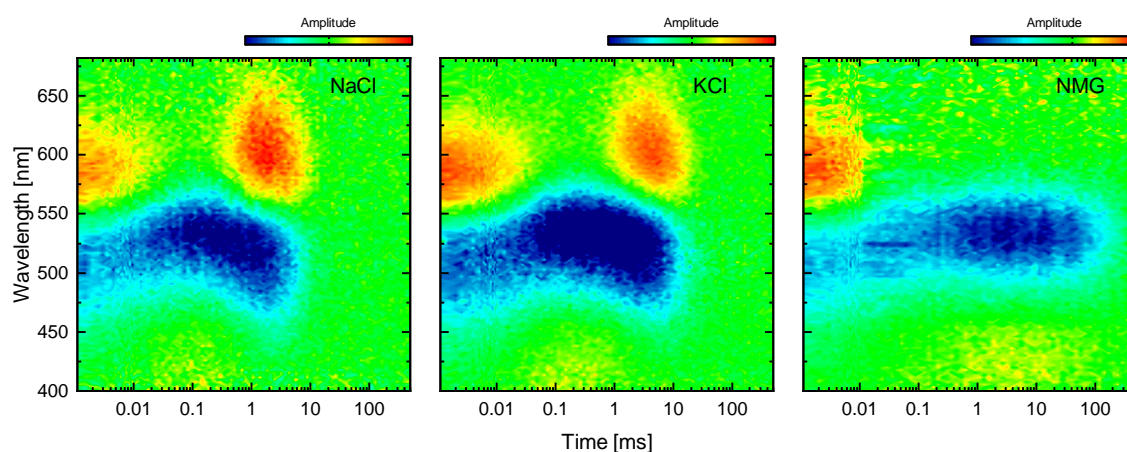


Abbildung 5.27: Blitzlichtphotolyse von KR2 bei pH 9.5 bei verschiedenen Salzbedingungen.

Da die Aufnahme der Na^+ -Ionen beim Übergang von M nach O passiert, wird das O Intermediat gern als spektraler Marker für den Na^+ Transport gewählt. [90] Für den normalen H^+ -Pumpzyklus unter NMG Bedingungen kann auch kein O Intermediat gemessen werden. Überraschenderweise zeigt jedoch auch die KCl Messung bei pH 8.5 ein O Intermediat mit geringerer Amplitude. Noch ausgeprägter wird dieser Effekt bei höherem pH Wert. Schaut man sich die Messungen bei pH 9.5 (Abbildung 5.27) an, so stellt man fest, dass die NaCl und KCl Messung sehr ähnlich sind. K^+ Transport wurde bisher in der Literatur nur von Vogt *et al.* kurz angedeutet, jedoch nicht weiter im Rahmen des Wildtyps besprochen. [91] Unter den von In-

oue *et al.* genutzten Bedingungen (pH 8.0 100 mM KCl, 0.1% DDM) konnte kein O Intermediat gemessen werden. [36] Elektrophysiologische Messungen unter den gleichen Bedingungen wie die hier gezeigten Blitzlichtphotolyse-Messungen konnten jedoch zeigen, dass bei hohen pH Werten die Transportaktivität in Gegenwart von K^+ -Ionen ansteigt. [92] Dies kann als Indiz dafür genommen werden, dass K^+ -Ionen transportiert werden können, dies geschieht anscheinend jedoch nur bei hohem pH Wert. Generell ist K^+ Transport auch mit Punktmutationen bei niedrigerem pH Wert möglich. Die Mutante G263F, sowie die Doppelmutante N61P/G263W können beide Kalium-Ionen transportieren. [48, 69] Mutiert man bei der Doppelmutante N61 nicht zu Prolin sondern zu Leucin, so ist es sogar möglich Cäsium-Ionen zu transportieren. [93] Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass generell genug Platz im Protein vorhanden ist, um auch größere Kationen zu transportieren.

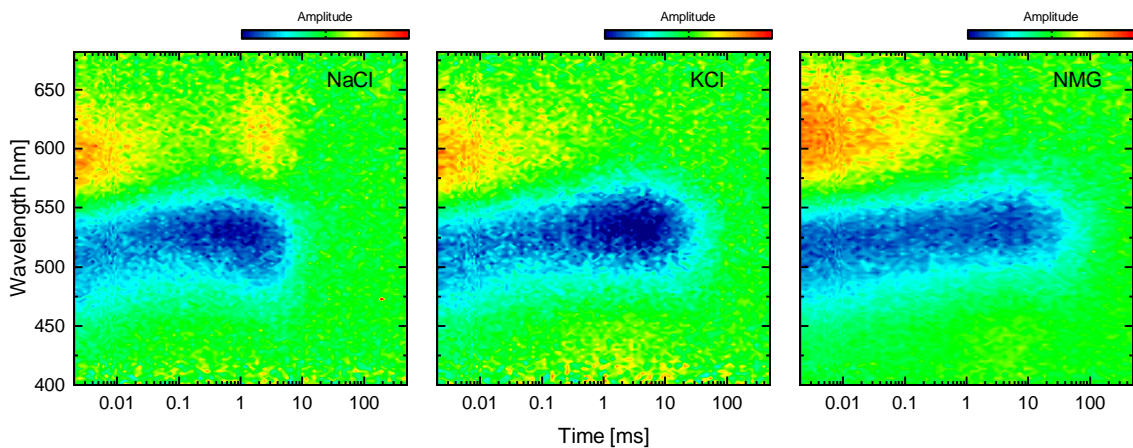


Abbildung 5.28: Blitzlichtphotolyse von KR2 bei pH 6 bei verschiedenen Salzbedingungen.

Betrachtet man die Photozyklen bei pH 6 (Abbildung 5.28) so sieht man, dass das O Intermediat für die KCl Messung komplett verschwindet und in der NaCl Messung nur noch eine sehr geringe Amplitude hat. Dies bedeutet, dass weniger Na^+ und so gut wie gar keine K^+ -Ionen mehr transportiert werden. Für das Natriumpumpen ändern sich die Lebenszeiten der Intermediate kaum im Vergleich zu pH 8.5 und 9.5, was einen Hinweis darauf gibt, dass KR2 biologisch gesehen als Na^+ -Pumpe gedacht ist und in diesem Modus auch am effektivsten arbeitet. Für die KCl und NMG Messungen beobachtet man eine Beschleunigung der Photozyklen bei pH 6, verglichen

mit den höheren pH Werten. Da in beiden Fällen Protonen transportiert werden sollten, macht dies auch Sinn, da bei niedrigem pH Wert die Protonen-Konzentration höher ist. Am stärksten ist der Effekt für die NMG Messung, hier lässt sich τ_4 nur für die Messung in pH 6 bestimmen, da die Zeit in den anderen pH Werten außerhalb des Messbereichs ($>500\text{ms}$) liegt.

Tabelle 5.1: Lebenszeiten von KR2 bei verschiedenen pH- und Salzbedingungen.

pH 8.5	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	τ_3 [ms]	τ_4 [ms]
NaCl	0.02	0.13	0.92	5.3
KCl	0.03	0.32	20	80
NMG	0.02	0.48	400	∞
pH 9.5				
NaCl	0.01	0.12	0.7	5.3
KCl	0.03	0.61	1.8	11
NMG	0.01	0.42	168	∞
pH 6				
NaCl	0.01	0.24	0.89	6.5
KCl	0.02	0.87	17	39
NMG	0.02	0.85	32.5	98

Generell lässt sich sagen, dass bei allen drei verschiedenen pH Werten in Anwesenheit von NaCl Na^+ transportiert werden sollte, da ein O Intermediat vorhanden ist. Dies funktioniert bei höherem pH Wert besser, als bei niedrigem, da hier die Konzentrationen an H^+ -Ionen, welche in Konkurrenz zu den Na^+ -Ionen für den Transport stehen, geringer ist. Auch liegt der native pH Wert des *Krokinobacter eikastus* eher im Alkalischen als im Sauren ($\sim \text{pH } 8$). Bei hohen pH Werten ($> \text{pH } 8.5$) besteht die Möglichkeit, dass auch K^+ -Ionen transportiert werden. Sinkt der pH Wert erhöht sich die H^+ Konzentration und die Amplitude des O Intermediats wird kleiner, was Hinweise auf einen geringeren (nicht Protonen) Ionentransport gibt. Gleichzeitig beschleunigt sich der Photozyklus für die Protonen-Pumpzyklen .

5.3.2 Einfluss der Umgebung auf den Photozyklus des KR2

Wie viele mikrobielle Rhodopsine ist auch KR2 sehr sensitiv auf die Bedingungen, in denen es sich befindet. Das einfachste Beispiel hierfür ist das Umschalten von

einer H^+ - zu einer Na^+ -Pumpe in Gegenwart von Natrium-Ionen. Es spielen jedoch nicht nur die Ionen, sondern auch die chemische Umgebung eine große Rolle. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Photozyklusdauer in Detergenz und Liposomen in NaCl leicht unterschiedlich ist, für LiCl jedoch in Detergenz drastisch langsamer ist als in Liposomen. [79] Ähnliche Studien wurden bereits für PR durchgeführt [94]

KR2 in Nanodisks

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch KR2 in Nanodisks untersucht. Nanodisks bestehen aus zwei Membran-Scaffold-Proteinen (MSP), die eine runde Doppelschicht aus Lipiden stabilisieren. [95] Die MSPs bestehen aus amphipathischen, helicalen Proteinen über dessen Länge auch die Größe der Nanodisk gesteuert werden kann. Normalerweise liegt der Durchmesser einer Nanodisk zwischen 8 und 16 nm. Die Disks sollen dem einzubauenden Membranprotein eine möglichst native Lipid Doppelschicht zur Verfügung stellen, wie es bei Liposomen der Fall ist. Für die optische Spektroskopie ist dies von Vorteil, da Liposomen auf Grund ihrer Größe sichtbares Licht sehr stark streuen. Da Nanodisks viel kleiner sind ist dies hier nicht der Fall.

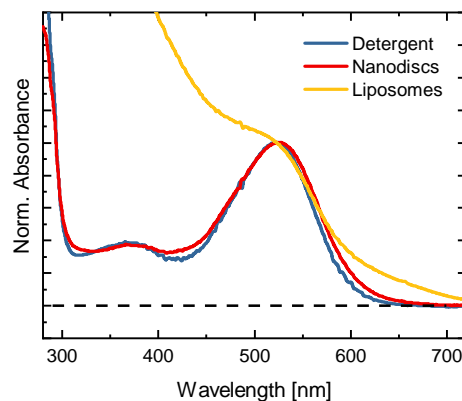


Abbildung 5.29: Absorptionsspektren von KR2 in Detergenz, Liposomen und Nanodisks bei pH 8.5 mit 50 mM NaCl.

Abbildung 5.29 zeigt die Absorptionsspektren von KR2 in Liposomen, Detergenz und Nanodisks. Hierbei fällt auf, dass die Detergenz- und Nanodisk-Spektren recht ähnlich sind und das Liposomen Spektrum stark durch Streulicht beeinflusst ist. Die Proben für die Messungen wurden von Dr. Erik Henrich aus dem Arbeitskreis

von Prof. Dötsch bereitgestellt. Als Scaffold-Protein wurde MSP1E3D1 genutzt und DMPG als Lipide. Die Proben wurden unter gleichen Bedingungen ebenfalls in der *Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption (LILBID)* Massenspektroskopie (Dr. Oliver Peetz, Arbeitsgruppe Prof. Morgner, Goethe Universität Frankfurt) gemessen, um den Oligomerisierungszustand herauszufinden und es wurden elektrophysiologische Experimente an der *Solid-Supported Membrane (SSM)* (Dr. Janina Sörmann, Arbeitsgruppe Prof. Bamberg, MPI Biophysik) durchgeführt um die Transportaktivität zu messen. [96] Dass SSM Messungen auch mit Nanodisks funktionieren, konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden.

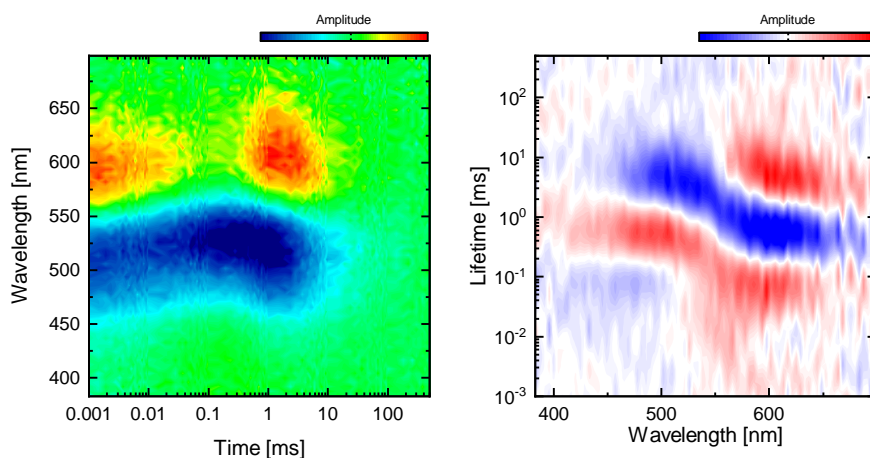


Abbildung 5.30: Blitzlichtphotolyse Messung von KR2 in Nanodisk mit 50 mM NaCl und pH 8.5. Farbkodierung des Konturplots der Blitzlichtphotolysemessung ist wie folgt: Blau markiert Bereiche mit negativer, grün mit keiner und rot mit positiver Absorptionsdifferenz. LDM wurde über die Lebenszeit Verteilungsanalyse der Blitzlichtphotolysedaten in OPTIMUS erhalten.

Abbildung 5.30 zeigt die Blitzlichtphotolysemessung an KR2 in Nanodisks bei pH 8.5 mit 50 mM NaCl. Alle Intermediate und ihre Übergänge sind sichtbar und liegen zeitlich ähnlich zu den Messungen in Liposomen. Generell sind die Verteilungen der Lebenszeiten etwas breiter, gerade gegen Ende des Photozyklus. Ein Grund hierfür könnte die Verteilung an Oligomeren Zuständen in den Nanodisks sein. Wie in den LILBID Messungen gezeigt werden konnte, sind bis zum Pentamer alle oligomeren Zustände vorhanden. [96] Nativ liegt KR2 als Pentamer vor, was auch für Struktur und Funktion wichtig zu sein scheint. [70]

5.3.3 Temperaturabhängigkeit des KR2 Wildtyps

Um einen besseren Einblick in den Photozyklus des KR2 Wildtyps zu bekommen, wurden zeitaufgelöste, temperaturabhängige Blitzlichtphotolysemessungen im Temperaturbereich von 10 - 40 °C vorgenommen. Hierfür wurde eine KR2 Probe in Liposomen mit einer Zusammensetzung von POPC, POPG und Cholesterol im Verhältnis 8:1:1 benutzt. Die Proben wurden von Janina Sörmann (MPI für Biophysik, Frankfurt) aus dem Arbeitskreis von Prof. Ernst Bamberg zur Verfügung gestellt. Der pH Wert wurde auf 8.5 eingestellt und die Probe enthielt zusätzlich noch 50 mM NaCl, sowie 50 mM TRIS. Der normale Küvettenhalter der in Unterabschnitt 3.1.2 beschriebenen Anlage wurde durch einen selbstgebauten, temperierbaren Halter ausgetauscht. Die Temperatur des Küvettenhalters wurde von einem Thermostaten (Pilot ONE, Krailing, Deutschland) konstant gehalten. Als Anregungswellenlänge wurde 525 nm mit einer Pulsenergie von ca. 2 mJ/cm² gewählt. Abbildung 5.31 zeigt die Zeitverläufe der Absorptionsänderungen für vier charakteristische Wellenlängen, 410, 460, 525, 610 nm bei Temperaturen zwischen 10 und 40 °C in 5 °C Schritten (Grün nach Rot).

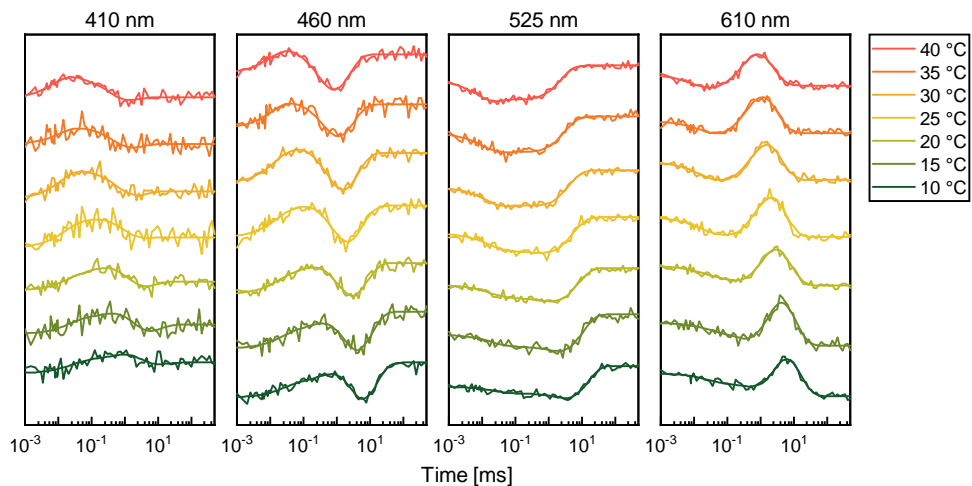


Abbildung 5.31: Temperaturabhängige Blitzlichtphotolysemessung mit Fits des KR2 Wildtyps bei pH 8.5 mit 50 mM in Proteoliposomen. Mit steigender Temperatur (von Grün nach Rot) kann eine Beschleunigung des Photozyklus beobachtet werden.

In der ersten Spalte sind die Transienten bei 410 nm zu sehen. Der Anstieg und Abfall des Signals im Mikrosekundenbereich wird hauptsächlich durch das blau-

verschobene M Intermediat verursacht. Auf der längeren (Millisekunden) Zeitskala sind hier keine Signale mehr zu erkennen. Die zweite Spalte beinhaltet die Transienten bei 460 nm. Der erste Anstieg des Signals ist dem L und M Intermediat zuzuschreiben, da beide in diesem Bereich absorbieren. Der zweite Anstieg im Millisekundenbereich ist das Verschwinden des Grundzustandsbleichens, welches gleichzeitig das Ende des Photozyklus signalisiert. Die Transienten bei 525 nm, welche in der dritten Spalte sichtbar sind, zeigen zuerst einen Zerfall auf der Mikrosekunden Zeitskala. Dieser ist durch den Zerfall des K Intermediats, welches mit dem Grundzustandsbleichen überlappt, verursacht. Der letzte Anstieg ist, wie auch schon bei den 460 nm Transienten, ebenfalls die Rückkehr in den Grundzustand. Der zuvor beobachtete Zerfall des rot-verschobenen K Intermediats ist am deutlichsten in den bei 610 nm aufgenommenen Transienten (4. Spalte Abbildung 5.31) zu erkennen. Das erste Abfallen des Signals beschreibt ebenfalls den Zerfall des K Intermediats, welches das früheste, in der Blitzlichtphotolyse detektierbare, Intermediat ist.

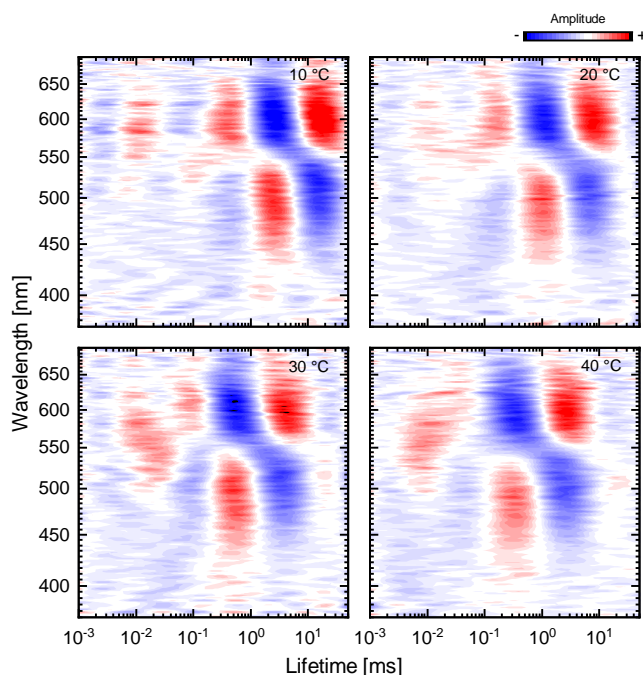


Abbildung 5.32: Lifetime Density Maps ausgewählter Temperaturen der temperaturabhängigen Blitzlichtphotolyse Daten des KR2 Wildtyps aus Abbildung 5.31. Positive (rot) Amplituden markieren Regionen mit einem Zerfall der Absorption oder Anstieg des Grundzustandsbleichens, negative (blau) Amplituden zeigen Regionen mit einem Anstieg der Absorption oder einem Zerfall des Grundzustandsbleichens.

Nach dessen Zerfall kann im frühen Millisekundenbereich der Aufbau des rot verschobenen O Intermediats beobachtet werden. Dieses Intermediat, welches ein Indikator für den Natriumtransport ist, zerfällt auch wieder im unteren Millisekundenbereich, zur gleichen Zeit wie das Verschwinden des Grundzustandsbleichens und signalisiert damit ebenfalls die Rückkehr in den Ausgangszustand. Generell verringert sich die Photozyklusdauer bei der Temperaturerhöhung von 10 auf 40 °C ungefähr um den Faktor Sechs. Um herauszufinden wie viele Komponenten für die *Target Analysis* notwendig sind, wurden die entsprechenden LDMs für die sieben Datensätze berechnet. Abbildung 5.32 zeigt die LDMs für 10, 20, 30 und 40 °C.

Die LDMs zeigen vier Hauptverteilungen, wobei die schnellste die geringste Temperaturabhängigkeit aufweist. Alle Lebenszeitverteilungen werden, mit steigender Temperatur, schneller. Am besten sichtbar ist dies im direkten Vergleich von den LDMs der Messungen bei 10 und 40 °C. Bei 40 °C ist die zweite Lebenszeitverteilung so viel schneller, dass sie kaum mehr von der ersten unterschieden werden kann. Die vier Komponenten, welche in den LDMs gefunden wurden, wurden als Startpunkt für die kinetische Modellierung des Photozyklus benutzt. Ebenfalls wurde die Probe auf mögliche Inhomogenitäten untersucht, indem die Wellenlängenabhängigkeit überprüft wurde.

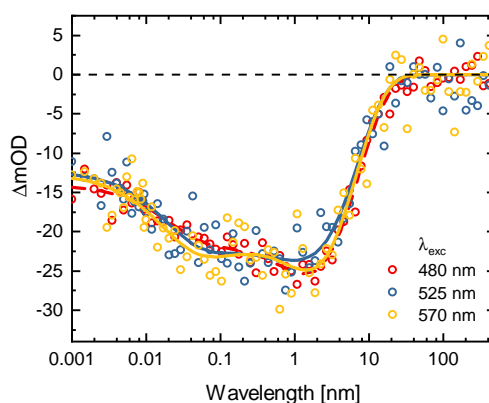


Abbildung 5.33: Wellenlängenabhängigkeit des KR2 WT. Anregung bei 480, 525 und 570 nm, Transienten des Grundzustandsbleichens bei 525 nm, extrahiert aus Breitbandblitzlichtphotolyse Messung mit den zugehörigen globalen Fits.

Hierfür wurde die Probe bei drei verschiedenen Wellenlänge, 480, 525 und 570 nm, in der Blitzlichtphotolyse angeregt und die Photozyklen aufgezeichnet (Transienten-

5.3. LANGZEITDYNAMIK DES KR2

te bei 525 nm in Abbildung 5.33). Die Daten wurden anschließend global gefittet, wobei für alle vier Lebenszeiten jeweils sehr ähnliche Werte gefunden. Da keine signifikanten Unterschiede in der Dynamik gefunden wurden, kann davon ausgegangen werden, dass keine Probeninhomogenitäten vorliegen, welche die kinetische Modellierung beeinflussen würden. Für die Modellierung wurden viele verschiedene kinetische Modelle an die temperaturabhängigen Blitzlichtphotolysedaten gefittet. Hierbei wurden verschiedene Möglichkeiten wie z.B. Verzweigungen des Photozyklus und unterschiedliche Rückraten in den Modellen getestet. Das Einführen von Rückraten hatte z.B. meist zum Ergebnis, dass die Energiebarrieren für die Rückreaktion gegen null gingen, was natürlich in einem echten Photozyklus nicht möglich ist. Dies war auch unabhängig davon, ob die Rückraten temperaturabhängig oder -unabhängig behandelt wurden. Überraschenderweise bot das einfachste sequentielle Modell $K \rightarrow L \rightarrow M \rightarrow O \rightarrow \text{GS}$, unter Berücksichtigung der Theorie des Übergangszustandes, den besten Fit der Daten, welcher keine offensichtlich falschen oder widersprüchlichen Parameter lieferte. Die Target Analysis wurde mit Hilfe von Dr. Chavdar Slavov im Programm OPTIMUS durchgeführt. [10]

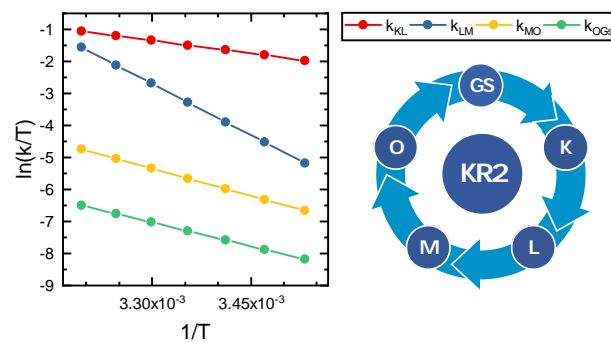


Abbildung 5.34: Eyring-Plot der Temperaturabhängigkeit von KR2 mit dem sequentiellen Photozyklus Modell.

Abbildung 5.34 zeigt den Eyring-Plot der temperaturabhängigen Daten. Hieraus ist klar ersichtlich, dass die zweite Rate (k_2), welche den Übergang von L nach M beschreibt und sich um den Faktor 40 mit einer Erhöhung der Temperatur vergrößert, die stärkste Temperaturabhängigkeit aller Raten aufweist. Mit einer Erhöhung um fast den Faktor drei weist die erste Rate (k_1) die niedrigste Temperaturabhängigkeit aller Raten auf. Die Temperaturabhängigkeiten der beiden verbliebenen beiden Ra-

ten, M nach O (k_3), sowie O in den Grundzustand (k_4), ähneln eher der des ersten Übergangs, als der des zweiten Übergangs. Die Aktivierungsenergien für die Übergänge können aus den linearen Fits des Eyring-Plots berechnet werden. Hierfür wird für die Enthalpie die Steigung und für die Entropie der jeweilige Achsenabschnitt benötigt. Geht man von der normalen Geradengleichung (Gleichung 5.1)

$$y = -m \cdot x + b \quad (5.1)$$

aus, so gilt für die Steigung m sowie den Achsenabschnitt b :

$$m = \frac{-\Delta H}{R} \quad (5.2)$$

$$b = \frac{\Delta S}{R} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) \quad (5.3)$$

Tabelle 5.2 zeigt einer Übersicht der verschiedenen Aktivierungsenergien der Übergänge, sowie die treibende Kraft der jeweiligen Prozesse.

Tabelle 5.2: Energiebarrieren.

	ΔH [kJ/mol]	$T\Delta S$ [kJ/mol]	ΔG [kJ/mol]	Treibende Kraft
K \rightarrow L	22.4	-40.4	62.8	$T\Delta S$
L \rightarrow M	89.2	22.3	66.9	ΔH
M \rightarrow O	47.2	-25.8	73.0	ΔH
O \rightarrow GZ	41.0	-36.2	77.8	\sim

Während der K \rightarrow L Übergang hauptsächlich von der Entropie getrieben zu sein scheint, werden die L \rightarrow M und M \rightarrow O Übergänge eher von der Enthalpie getrieben. Bei dem letzten Übergang O \rightarrow GZ scheint die Energie recht gleich über Enthalpie und Entropie verteilt zu sein, so dass man hier keine klare Aussage über die treibende Kraft dieses Reaktionsschrittes treffen kann.

Die transienten Populationen der verschiedenen Photozyklus-Intermediate sind in Abbildung 5.35 dargestellt. Da zuvor keine Wellenlängenabhängigkeiten, und damit

auch keine Inhomogenitäten, festgestellt werden konnten, wurde mit 100% Population im K Intermediat gestartet. Ausgehend vom K Intermediat, werden das L, M und O Intermediat fortlaufend gebildet, dieser Prozess wird bei höheren Temperaturen beschleunigt.

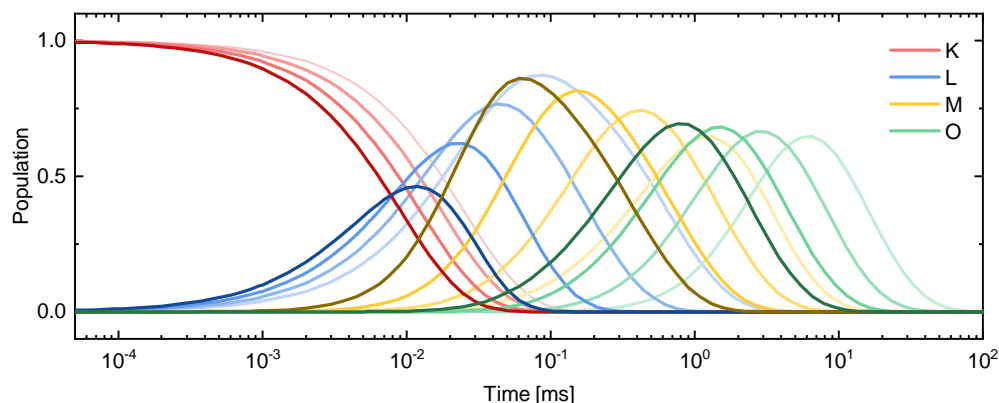


Abbildung 5.35: Transiente Populationen der Photointermediate im KR2 Photozyklus bei verschiedenen Temperaturen. Hellere Farben entsprechen niedrigeren Temperaturen, dunklere Farben entsprechen höheren Temperaturen (10 - 40 °C in 10 °C Schritten)

Die größte Änderung in den Populationen mit der Temperatur kann im L Intermediat beobachtet werden, die Population sinkt stark bei erhöhter Temperatur, während etwas mehr M gebildet wird. Dieses Verhalten spiegelt sich natürlich auch, wie zuvor schon gezeigt, in der Temperaturabhängigkeit der Raten wieder: während die K nach L Rate nur leicht mit der Temperatur ansteigt, steigt die L nach M Rate jedoch drastisch an. Dies bedeutet, dass L auf einer ähnlichen Zeitskala gebildet wird, bei höheren Temperaturen jedoch viel schneller wieder in das M Intermediat zerfällt, was die Gesamtpopulation an akkumuliertem L Intermediat verringert. Die Population des O Intermediates bleibt von der Amplitude her recht ähnlich, wird nur mit steigender Temperatur früher auf und wieder abgebaut.

Neben den Populationen bekommt man über die Target Analysis auch die *Evolution Associated Difference Spectra* (EADS). Die EADS repräsentieren die Differenzspektren, welche den vier verschiedenen Zuständen, die für die *Target Analysis* benutzt wurden, zugeordnet werden können und geben dadurch Informationen über die spektralen Veränderungen jedes Zustandes für die verschiedenen Temperaturen (Abbildung 5.36). Um die genaue spektrale Position und Form der Spektren der

Zustände zu erhalten, müssen diese um das Grundzustandsbleichen, welches in den EADS noch enthalten ist, korrigiert werden.

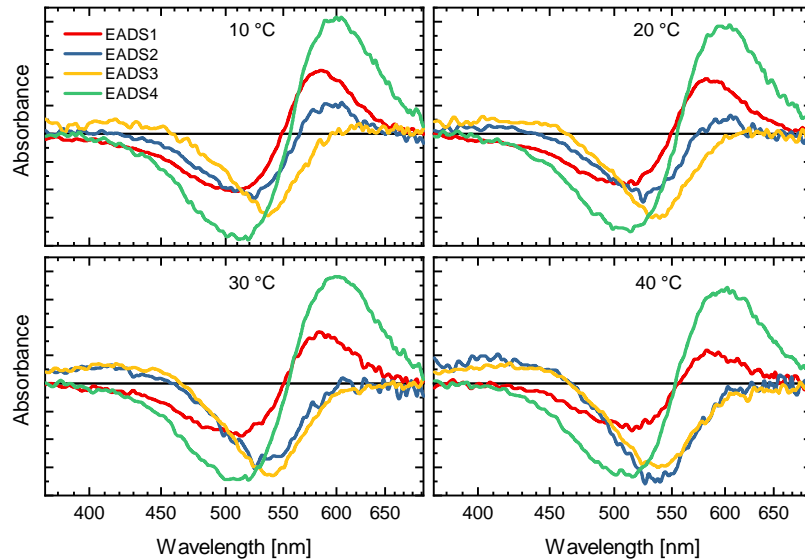


Abbildung 5.36: *Evolution Associated Difference Spectra* der verschiedenen Photozyklusintermediate bei verschiedenen Temperaturen des KR2 Wildtyps.

Korrigiert man diese, so erhält man die *Evolution Associated Spectra* (EAS), welche die Reinspektren des jeweiligen Zustandes repräsentieren. Um die EADS um das Grundzustandsbleichen korrigieren zu können, muss zuerst der Retinalpeak aus dem Grundzustandsabsorptionsspektrum extrahiert werden. Hier ist es wichtig, nur den Retinalpeak ($\lambda_{max} = 525 \text{ nm}$) und nicht das ganze Absorptionsspektrum zu nutzen. Die anderen Beiträge im Absorptionsspektrum, wie der Proteinpeak ($\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$), welcher hauptsächlich aus der Absorption der Thyrosine und Tryptophane des Proteins besteht, und der Peak um 380 nm , welcher freies Retinal, deprotonierte Retinalschiffbase und in manch anderen Retinalproteinen auch den $S_0 \rightarrow S_2$ Übergang [97] enthalten könnte, werden nicht im Blitzlichtphotolyseexperiment mit angeregt. Würden diese Banden ebenfalls angeregt werden, so müsste an diesen Positionen auch ein Bleichsignal in dem Spektren enthalten sein. Dies ist aber weder in der Blitzlichtphotolyse noch in den Ultrakurzzeitmessungen der Fall.

Aufgrund der Lichtstreuung der Liposomen, welche für diese Untersuchung genutzt wurden, ist die Extraktion des Retinal Peaks komplexer als für Proben, welche z.B. in Nanodisks oder Detergenz solubilisiert sind. Zuerst muss das Absorptionsspek-

trum um die Lichtstreckurve korrigiert werden. Da diese von der jeweiligen Probe abhängt, kann man diese nicht separat, z.B. an Lösungsmittel mit leeren Liposomen, messen und dann von der Probenmessung subtrahieren. Um trotzdem die Streulichtkurve abziehen zu können benutzt man hier ein Detergenzspektrum, welches so gut wie keine Streulichtanteile hat. Durch Differenzbildung des Liposomen- und Detergenzspektrums bekommt man eine Kurve, welche der Streulichtkurve ähnelt. Diese wird anschließend mit einer Funktion gefittet. Hierbei hat sich die Funktion

$$y = \frac{A \cdot 10^8}{\lambda^B} + C \cdot \text{offset} \quad (5.4)$$

für diese Art von Streulichtkurven bewährt, wobei A, B und C die zu bestimmenden Parameter sind und der Offset aus dem letzten Datenpunkt des Spektrums berechnet wird. Mögliche Startwerte sowie Grenzen für A, B und C sind in Tabelle 5.3 dargestellt.

Tabelle 5.3: Startwerte und Grenzen für den Fit der Streulichtkurve.

	A	B	C
Startwert	-50	0.3	1
untere Grenze	-1000	0	0
obere Grenze	1000	0.8	5

Nachdem die Streulichtkurve der Liposomen vom Absorptionsspektrum abgezogen wurde, erhält man das unüberlagerte statische Absorptionsspektrum. In diesem Spektrum muss anschließend nur der Retinalpeak mit Hilfe einer Gaussfunktion gefittet werden, um das reine Signal für die Korrektur des Grundzustandsbleichens zu bekommen. Die hier erhaltene Gaussfunktion wurde mit einem Skalierungsfaktor auf die EADS addiert, um zu den EAS (Abbildung 5.37) zu gelangen. Auf den ersten Blick verändern sich die Spektren vom K, M und O kaum, während das L Intermediat eine starke Temperaturabhängigkeit aufweist. Dieses verschiebt sich von einem eher K ähnlichen Spektrum bei niedrigen Temperaturen zu einem Spektrum bei 40 °C, welches fast identisch zum M Intermediat ist.

Bei Raumtemperatur (20 °C) liegt es spektral zwischen dem K und M Intermediat,

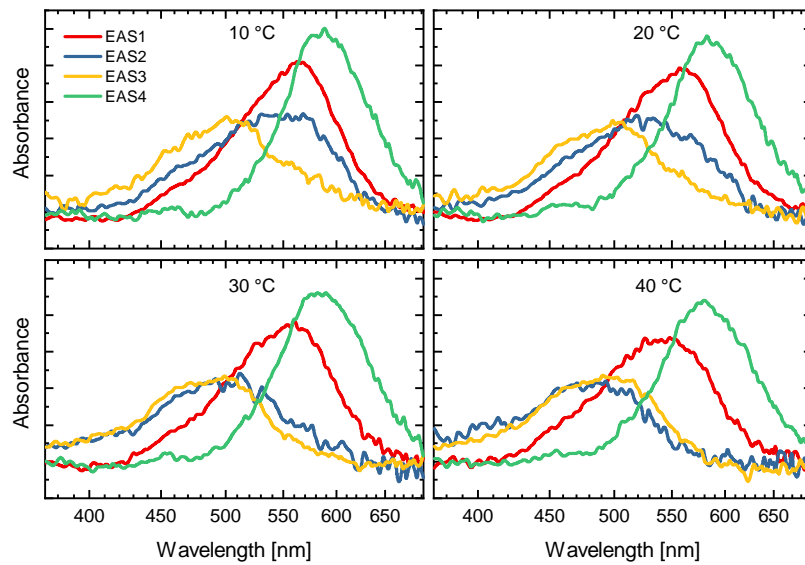


Abbildung 5.37: *Evolution Associated Spectra* der verschiedenen Photozyklusintermediate bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit der Wellenlänge.

wo man es auch laut Literatur erwarten würde [36]. Betrachtet man die Intermediatsspektren genauer, so stellt man fest, dass die Spektren wahrscheinlich mehrere Komponenten enthalten, obwohl das sequentielle Modell die besten Resultate in der Target Analysis lieferte.

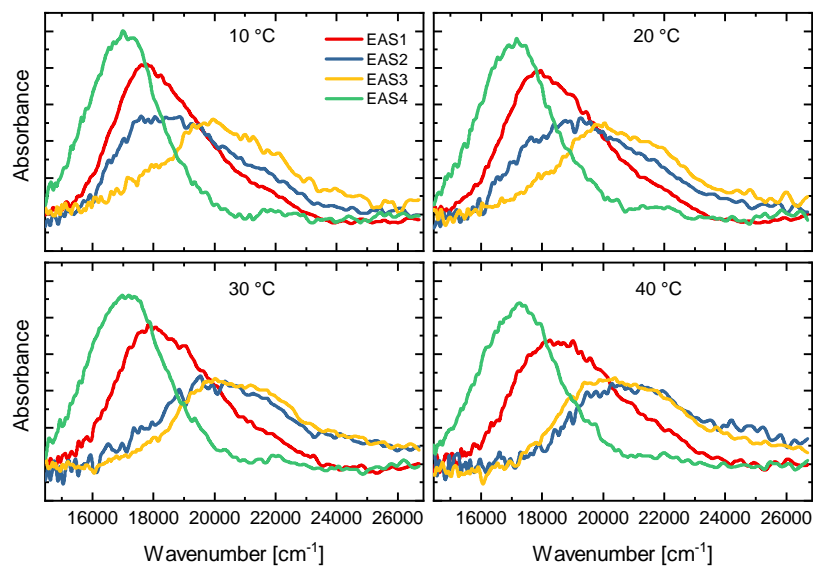


Abbildung 5.38: *Evolution Associated Spectra* der verschiedenen Photozyklusintermediate bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit der Wellenzahl (Energieskala).

Um dies weiter zu untersuchen, wurden die EAS für alle Temperaturen zuerst auf die Energieskala konvertiert (Abbildung 5.38), um sie dann zu entfalten. Hierfür wurden alle vier EAS bei einer Temperatur gleichzeitig mit einem Satz von vier Gaussfunktionen, welche die K, L, M und O Reinspektren repräsentieren sollen, gefittet. Als Fitparameter wurden die Zentralposition, sowie die Breite der Gaussfunktion gewählt. Um Temperatureffekte in den Spektren nicht zu vernachlässigen wurde dies unabhängig voneinander für jede Temperatur durchgeführt. Insgesamt wichen die Werte, bei allen Temperaturen, jedoch nur sehr gering voneinander ab. Für die Zentralposition wurde eine Variation von ca. 0.6% und für die Breite eine Variation von ca. 7% über alle Temperaturen ermittelt.

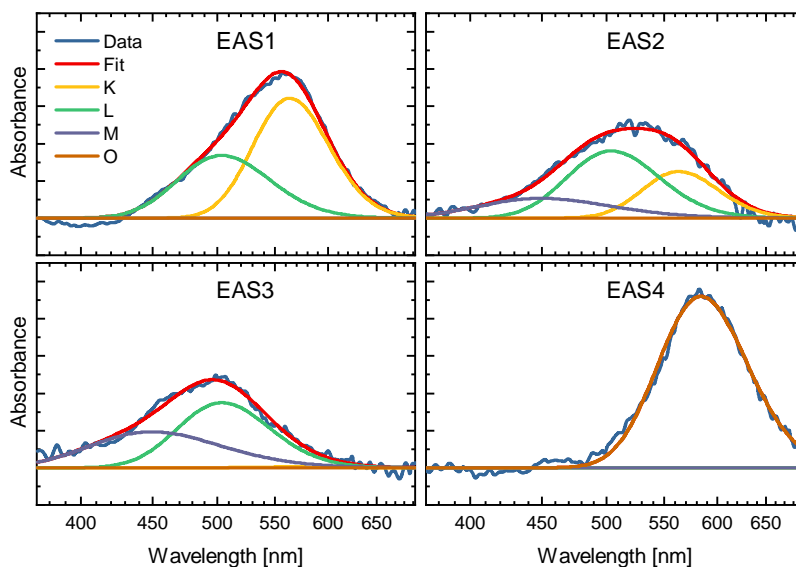


Abbildung 5.39: Spektrale Entfaltung der EAS bei 20 °C. K, L, M und O zeigen die Reinspektren der jeweiligen Intermediate.

Abbildung 5.39 zeigt die spektrale Entfaltung der EAS bei 20 °C. Die Entfaltung der ersten Spezies zeigt, dass diese aus zwei verschiedenen Gaussfunktionen, welche das K und L Intermediat widerspiegeln, besteht. Die zweite und dritte Spezies besteht aus jeweils 3 Gaussfunktionen, die die K, L und M Intermediate beschreiben. Hierbei variiert hauptsächlich die Amplitude der Gaussfunktionen, was die verschiedenen Anteile der Intermediate an der Spezies zu den unterschiedlichen Zeitpunkten beschreibt. Abgesehen vom O Intermediat, welches immer durch eine einzelne Gaussfunktion beschrieben werden kann, variiert die Zusammensetzung der einzel-

nen Gaussfunktionen leicht mit der Temperatur. Der größte Unterschied hier kann bei der zweiten und dritten Spezies beobachtet werden. Hier kann bei 10 °C eine Mischung aus K, L und M beobachtet werden, während hingegen bei 40 °C nur eine Mischung aus L und M zu sehen ist. Die Zentralwellenlängen und Halbwertsbreiten (engl. Full Width Half Maximum, FWHM) für die verschiedenen gefitteten Gausprofile der Intermediate sind in Tabelle 5.4 aufgetragen.

Tabelle 5.4: Zentralwellenzahl ($\tilde{\nu}_{max}$) Halbwertsbreite (FWHM) für die gefitteten Photozyklusintermediate K, L, M und O.

	K	L	M	O
$\tilde{\nu}_{max}$ [cm ⁻¹]	17747	19835	22249	17118
FWHM [cm ⁻¹]	1103	1503	2380	1250

Mit einer Breite von 2380 cm⁻¹ (\cong 48 nm) ist das M Intermediat das spektral breiteste, während K das schmalste mit 1103 cm⁻¹ (\cong 35 nm) ist. L und O reihen sich mit jeweils 1503 cm⁻¹ (\cong 38 nm) und 1250 cm⁻¹ (\cong 43 nm) in die Mitte ein. Etwas überraschend ist die spektrale Lage des M Intermediats bei 22249 cm⁻¹ (\cong 449 nm), welches normalerweise um 400 nm für andere Retinalproteine wie z.B. PR [98] gelegen ist. Die restlichen Intermediate, K, L und O liegen in dem Wellenlängenbereich wo man sie auch von anderen Retinalproteinen her erwarten würde (Abbildung 5.40 & Tabelle 5.4).

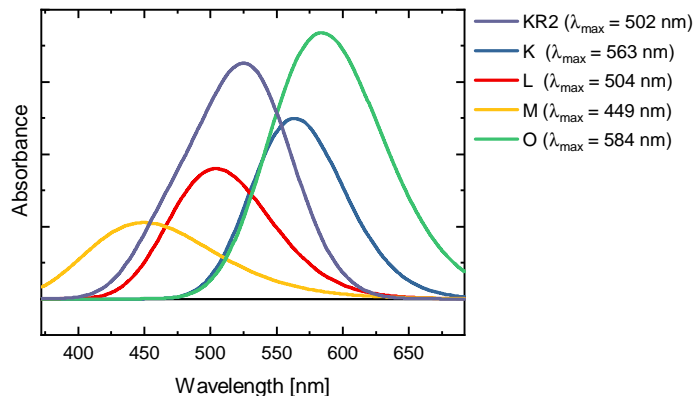


Abbildung 5.40: Reinspektren der KR2 Photointermediate.

Wird ein kinetischer Gleichgewichtszustand durch mehr als eine Gaussfunktion be-

schrieben, so kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Intermediaten handelt. In diesem Fall konnten die Gleichgewichte jedoch nicht mittels der *Target Analysis* aufgelöst werden, sondern nur die Übergänge zwischen verschiedenen Gleichgewichten, da diese wahrscheinlich zu schnell equilibrieren.

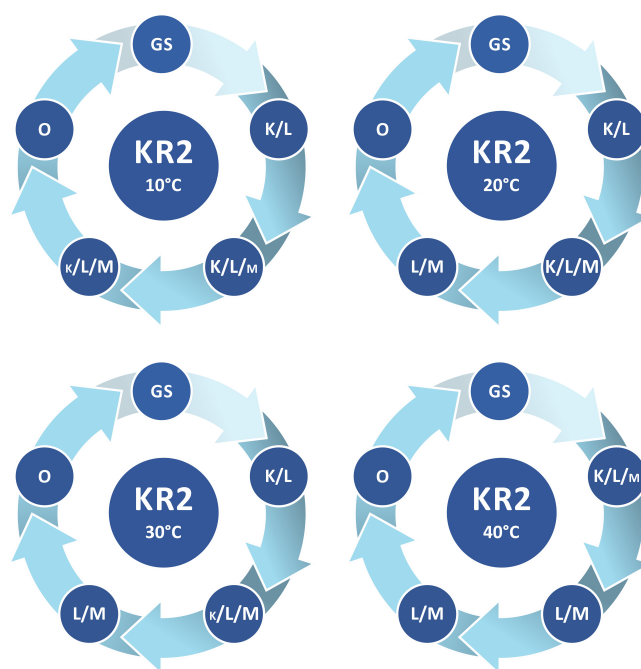


Abbildung 5.41: Gleichgewichte der Photointermediate in KR2 bei verschiedenen Temperaturen.

Vergleicht man diese bei den verschiedenen Temperaturen, so kann man Verschiebungen in den Gleichgewichten erkennen. Die Photozyklen bei den verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 5.41 dargestellt. Bei 10 °C startet man in einem K/L Gleichgewicht und hat bis zum Übergang in das O Intermediat noch einen kleinen Beitrag des K Intermediates zu den Gleichgewichten. Bei 40 °C hingegen ist schon im ersten Zustand ein kleiner Beitrag des M Intermediates zu sehen, sodass man direkt in einem K/L/M Gleichgewicht startet. Im zweiten Zustand ist hier schon kein Beitrag von K mehr enthalten. Dies bedeutet, dass man direkt in das L/M Gleichgewicht übergeht, welches nur das Gleichgewicht zwischen den beiden Intermediaten verschiebt, bis man schließlich in das O Intermediat übergeht. Bei

Raumtemperatur (20 °C) startet man in einem K/L Gleichgewicht, von dort bildet sich ein K/L/M Gleichgewicht, welches anschließend in ein L/M Gleichgewicht übergeht. Von dort aus bildet sich anschließend das O Intermediat, welches als einziges bei keiner Temperatur ein Gleichgewicht eingeht.

5.3.4 Tieftemperaturmessungen an KR2

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Glaubitz (Institut für Biophysikalische Chemie, Universität Frankfurt) wurden Tieftemperaturexperimente zum Einfangen der Photointermediate durchgeführt. Diese Messungen dienen dazu herauszufinden, unter welchen Bedingungen man welche Photointermediate einfangen kann. Die Experimente wurden mit einem selbstgebauten UV/vis-Tieftemperaturabsorptionsspektrometer durchgeführt, hierbei ist die Proben temperatur zwischen 77 K und ungefähr 300 K einstellbar. Die Anlage besteht hauptsächlich aus einem Kryostaten (Optistat DN, Oxford Instruments, Abingdon, England), einer Weißlichtquelle (DH-200-BAL, Ocean Optics, Dunedin, USA) für das Abtastlicht und einem Faserspektrometer (USB2000+, Ocean Optics, Dunedin, USA). Die Anregung der Probe kann durch eine extern eingekoppelte LED (Thorlabs, Austin, USA) durchgeführt werden. Eine genauere Beschreibung des Aufbaus und der Durchführung der Experimente kann der Dissertation von Dr. Henrik Gustmann entnommen werden. [99] Ziel der Experimente war es zu charakterisieren, bei welchen Temperaturen welche Intermediate eingefangen und spektroskopiert werden können. Die Zuweisung der Intermediate kann über die Absorptionsspektren bei den jeweiligen Temperaturen im Vergleich mit den Blitzlichtphotolyse-Differenzspektren erfolgen. Das Einfangen der Intermediate ist wichtig für die *dynamic nuclear polarization* (DNP) erweiterten Festkörper NMR Experimente [100], welche in dem Arbeitskreis von Prof. Glaubitz durchgeführt werden, um die Strukturen der Intermediate zu bestimmen.

Die Probe für diese Experimente wurde von Orawan Jakdetchai aus dem Arbeitskreis Glaubitz zur Verfügung gestellt. Der wässrige Puffer war auf einen pH Wert von 8.5 eingestellt und enthielt 30 mM NaCl. Um die Tieftemperaturspektren zu erhalten wurde die Probe zunächst in einer CaF₂ Sandwichküvette vorbereitet. In der Zwischenzeit wurde der Kryostat auf 110 K temperiert. Damit die Probe gut messbar ist,

muss es beim Einfrieren der Probe zu einem Glasübergang kommen. Dies ist wahrscheinlicher, wenn die Proben abrupt eingefroren werden, weshalb die Probe direkt in den Kryostaten bei 110 K eingeführt wurde. Bildet sich ein amorphes Glas, so ist Probe leicht durchsichtig und es findet weniger Streuung des Abtastlichts statt, als bei der Bildung von vielen kleinen Eiskristallen, welche das sichtbare Licht sehr stark streuen. Der Puffer der Proben enthielt für die Tieftemperaturmessungen einen Glycerinanteil von 60% als Frostschutzmittel und um die Ausbildung des Glasübergangs zu erleichtern. Nach dem Einfrieren der Probe mit erfolgreicher Bildung des Glasübergangs kann ein Referenz-Dunkelspektrum aufgezeichnet werden, welches später für die Berechnung der Differenzspektren benötigt wird. Anschließend wird die Probe mit einer LED für einige Zeit belichtet, um den Photozyklus anzuregen. Aufgrund der geringen thermischen Energie können bestimmte Energiebarrieren im Photozyklus nicht überwunden werden, weshalb einige Photointermediate, bei bestimmten Temperaturen, „eingefangen“ werden können. Vom den somit eingefangenen Photointermediat wird anschließend ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Mit Hilfe des Dunkelspektrums kann so das Differenzspektrum gebildet werden, welches mit den EADS aus den Blitzlichtphotolysedaten (Unterabschnitt 5.3.4) verglichen werden kann.

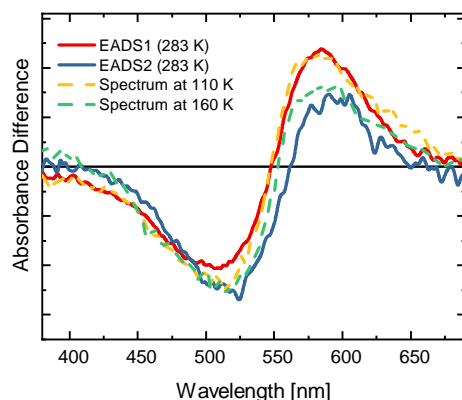


Abbildung 5.42: Tieftemperaturspektren von KR2 bei 110 und 160 K im Vergleich mit EADS1 und EADS2 aus der Blitzlichtphotolyse bei 20 °C.

Die gleiche Prozedur wird anschließend nach dem Auftauen der Probe bei anderen Temperaturen wiederholt. Alternativ kann auch die Temperatur der belichteten Probe langsam erhöht werden (z.B. in 10 K Schritten) und dann jeweils ein Spektrum

genommen werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den NMR Daten wurde hier jedoch die erste Methode gewählt. Abbildung 5.42 zeigt die Tieftemperaturspektren bei 110 und 160 K im Vergleich mit den EADS1 und EADS2 bei 20 °C aus der Blitzlichtphotolyse (Unterabschnitt 5.3.4). Vergleicht man das Spektrum bei 110 K mit dem EADS1 Spektrum so stellt man fest, dass diese nahezu identisch sind. Auch ist das 160 K Spektrum sehr ähnlich dem EADS2. Aus der Blitzlichtphotolyse ist bekannt, dass beide EADS hauptsächlich ein K/L Gleichgewicht enthalten, wobei das Gleichgewicht für EADS1 eher auf der Seite des K Intermediats und für EADS2 mehr auf der Seite des L Intermediates liegt. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den NMR Messungen von Orawan Jaktetchai (Arbeitskreis Glaubitz), die in diesem Temperaturbereich ebenfalls eine Verschiebung eines Gleichgewichts sehen kann (Manuskript in Vorbereitung). Um 180 K trifft man den Phasenübergang, hierbei bilden sich unvermeidlich viele Kristalle, wodurch die Probe zu stark streut, um noch ein nutzbares Absorptionsspektrum aufzunehmen. Bei 230 K ist die Probe bereits flüssig und kann wieder problemlos gemessen werden. Belichtet man bei dieser Temperatur und nimmt in Abständen von mehreren Minuten Spektren auf, so sieht man, dass das Protein hier schon weiter reagieren kann und die Photointermediate nicht mehr eingefangen werden können.

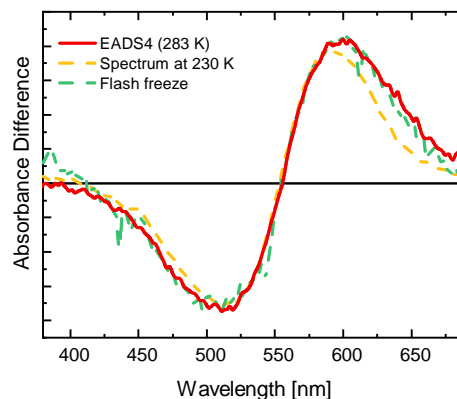


Abbildung 5.43: Tieftemperaturspektren von KR2 bei 230 K und flashfreeze im Vergleich mit EADS4 aus der Blitzlichtphotolyse.

Um das Weiterreagieren zu verhindern, muss die Probe wieder auf 110 K abgekühlt werden, allerdings kann auch hier während des Kühlprozesses das Protein noch weiter reagieren. Zum Einfangen späterer Intermediate ist dies also eher ungeeignet, hier

eignet sich die Schockgefrier-Methode (flash freeze) besser. Bei dieser Methode wird die Probe während der Belichtung in flüssigen Stickstoff getaucht und schockgefroren. Hierbei fängt man zwar ein Ensemble aller Intermediate ein, jedoch akkumuliert das Intermediat mit der längsten Lebensdauer am meisten. Für KR2 ist dies das O Intermediat, welches in dem EADS4 aus der Blitzlichtphotolyse repräsentiert ist. Vergleicht man nun die Spektren des Schockgefrierens, bei 230 K und die EADS4 (Abbildung 5.43), so sieht man, dass das Schockgefrieren der EADS4 am ähnlichsten ist. Generell war es nicht möglich einen Zustand einzufangen, in dem signifikant das M Intermediat angereichert war.

5.3.5 Zusammenfassung & Diskussion

In Abschnitt 5.3 wurde der Photozyklus des KR2 Wildtyps mit Hilfe von Blitzlichtphotolyse und Tieftemperaturmessungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die chemische Umgebung einen immensen Einfluss auf den Photozyklus, und damit auch auf die Funktion des Proteins hat. Sind Natrium-Ionen in der Lösung enthalten, so transportiert KR2 hauptsächlich Natrium-Ionen, als spektraler Marker hierfür dient das O Intermediat, welches bei den Messungen ohne Salz fehlt. Korreliert man die sichtbaren Messungen mit IR Messungen, kann gezeigt werden, dass während des O Intermediats größere Änderungen in der Amid I Bande (1652 cm^{-1}) sichtbar werden, die jedoch in den Messungen ohne Salz fehlen. [101] Grund hierfür könnte die Interaktion des Natrium-Ions mit Wassermolekülen im Transportweg sein. Änderungen in der Amid I Bande können zum Beispiel von Änderungen in den Wasserstoffbrücken mit den Carbonyl-Gruppen der α -Helices hervorgerufen werden. Sind statt Natrium-, Kalium-Ionen in der Lösung enthalten so bildet sich bei pH 8.5 ein O Intermediat mit geringer Amplitude, welches bei höherem pH Wert (9.5) eine ähnliche Amplitude wie in der Messung mit NaCl ausbildet. Dies, in Kombination mit den elektrophysiologischen Messungen von Dr. Janina Sörmann [92], gibt erste Hinweise auf einen möglichen Kalium-Ionen Transport, welcher bisher in der Literatur kaum besprochen wurde. Dieser scheint jedoch erst bei hohen pH Werten aufzutreten. Kalium-Ionen Transport ist in der Literatur bisher nur von Mutanten bekannt wie zum Beispiel der G263F Mutante. [69] Diese Aminosäure sitzt im Bereich der

Ionen-Aufnahmekavität an der zytoplasmatischen Seite des Proteins und ist Teil des Ionen-Selektivitätsfilters. Vergleicht man die Kristallstrukturen des Wildtyps und der Mutante, so findet man ausser des sterisch anspruchsvollen Phenyl-Restes kaum Unterschiede am Rest des Proteingerüsts. [70] Wenn diese Punktmutation also ausreicht, um das Protein in eine funktionale K^+ -Pumpe zu konvertieren, bedeutet dies, dass der Transportweg durch das Protein groß genug sein muss, um auch K^+ -Ionen transportieren zu können. Dies unterstützt zusätzlich die These, dass der Wildtyp bei hohen pH Werten auch Kalium-Ionen transportieren kann. Ist der pH Wert gering (pH 6), sollten trotz der Anwesenheit von Kalium-Ionen trotzdem Protonen gepumpt werden. Vergleicht man die Lebenszeiten der Intermediate in Anwesenheit von NaCl und NMG, so stellt man fest, dass der Natrium-Pumpmodus zeitlich relativ unabhängig vom pH Wert ist, der Protonen-Pumpmodus jedoch mit niedrigem pH Wert viel schneller wird, jedoch immer langsamer bleibt, als der Natrium-Pumpmodus. Durch die temperaturabhängigen Messungen konnten die Rein-Intermediatsspektren der einzelnen Photozyklusintermediate, sowie die Übergangsbarrieren und die im Photozyklus vorhandenen Gleichgewichte berechnet werden. Auffällig hierbei ist die geringe Blauverschiebung des M Intermediates im Vergleich zu anderen mikrobiellen Rhodopsinen. [98, 102] Grund hierfür könnte eine andere Elektrostatik in der Retinal-Bindetasche sein, welche den Natrium-Ionen-Transport ermöglicht. Schon im Grundzustand ist das Retinal in KR2, im Gegensatz zu BR, verdreht, was anhand der HOOP (*Hydrogen out of plane*) Moden gezeigt werden konnte. [103, 104] Während des M Intermediates liegt die Verdrillung bei KR2 hauptsächlich im Bereich von C9 bis C12 vor, während BR während des M Intermediates eine eher planare Struktur einnimmt. [104] Auch dient die Deprotonierung der Retinalschiffbase während des M Intermediates in KR2 eher dazu, die elektrostatische Repulsion der positiven Ladung für das zu transportierende Natrium-Ion zu entfernen, während es in BR ein Teil des Transportmechanismus ist. Ein weiterer Grund für die geringere Blauverschiebung kann die Methode sein, die angewandt wurde, um die Intermediate zu berechnen. Ein erster Versuch die Spektren einiger der Photointermediate zu berechnen, wurde bereits von Inoue *et al.* unternommen. [36] Diese verwendeten die DAS und korrigierten diese mit dem kompletten Absorptionsspektrum des Proteins. Diese Methode hat jedoch ein paar Nachteile, wodurch sich nicht

die korrekten Intermediatsspektren berechnen lassen: Zuerst ist die Benutzung der DAS ungeeignet für die Berechnung von Spektren, da die DAS neben den spektralen auch noch kinetische Informationen enthält. Diese dürfen jedoch nicht mehr in den berechneten Reinspektren enthalten sein. Des Weiteren wurde zur Korrektur des Grundzustandsbleichens das komplette Absorptionsspektrum des Proteins genutzt, dies bedeutet dass auch die Absorptionen im blauen Spektralbereich mit aufaddiert werden, obwohl diese nicht mit angeregt werden und auch keine Bleichbanden in den Messungen zeigen. Durch die zusätzliche Addition der Banden im blauen Spektralbereich verschieben sich natürlich auch die Absorptionsmaxima der damit berechneten Spektren zu kürzeren Wellenlängen. Die in dieser Arbeit eingeführte Methode zur Berechnung der Reinspektren umgeht diese Probleme durch die Benutzung der EADS und die Korrektur des Bleichens durch den Retinalpeak des Absorptionsspektrums.

Im Zuge der *Target Analysis* wurden viele verschiedene Modelle getestet. Hierbei wurden auch Modelle mit Verzweigungen, Rückraten und temperaturunabhängigen Rückraten ausprobiert. Überraschenderweise lieferte das einfachste, sequentielle Modell die besten Ergebnisse. Das Einbeziehen von Rückraten zum kinetischen Modell lieferte zwar einen guten Fit der Daten, gleichzeitig jedoch auch physikalisch nicht sinnvolle Parameter wie zum Beispiel Aktivierungsbarrieren der Rückraten die nahezu 0 kJ/mol betragen. Aufgrund der physikalisch falschen Parameter wurden diese Modelle ausgeschlossen. Dass in den finalen Photozyklen doch Gleichgewichte enthalten sind, konnte mit Hilfe der Entfaltung der Spektren berechnet werden. Ein Grund dafür, weshalb dies nicht in der *Target Analysis* bereits aufgelöst werden konnte, könnte sein, dass sich die Gleichgewichte zu schnell einstellen und man nur die sequentiellen Übergänge zwischen den verschiedenen Gleichgewichten beobachten kann. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass das O Intermediat keine Gleichgewichte eingeht. Dies bedeutet dass der Schritt von M nach O unidirektional sein muss und einen irreversiblen Schritt, wie einen Switch in BR (IST Modell, *isomerization/switch/transfer*) [105] beinhaltet.

Teil IV

Zusammenfassung

Kapitel 6

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an zwei verschiedenen Retinalproteinen durchgeführt. Das in Kapitel 4 analysierte Retinalprotein, Channelrhodopsin 2, wurde hauptsächlich auf die Beziehung zwischen Retinalisomerisierung und Photozyklus bzw. Funktionalität untersucht. Hierfür wurde das Chromophor *all-trans* Retinal durch verschiedene, sterisch anspruchsvolle, Retinalanaloga ersetzt. Das 9,12-Phenylretinal wurde bereits in BR erfolgreich eingesetzt, um die Isomerisierung des *all-trans* Retinals zum 13-*cis* Retinal in der Bindetasche zu verhindern und die Funktionalität des Proteins zu stoppen. In ChR2 hingegen kann das Phenylretinal nach Lichtanregung isomerisieren und ein Photoprodukt bilden, welches anschließend einen modifizierten Photozyklus durchläuft (Abschnitt 4.2). In diesen Photozyklus zerfällt das erste Photoprodukt P_1' sehr schnell und bildet ein zusätzliches Intermediat, P_x , welches zeitlich zwischen dem P_1' und P_2' Intermediat liegt und eine grundzustandsähnliche Absorptionsbande besitzt. Im Vergleich zum Wildtyp läuft der modifizierte Photozyklus schneller ab als im Wildtyp und das Protein behält seine Funktion. Abschnitt 4.3 behandelt das *trans*-locked Retinal, welches sich als schwierig in das Protein einzubauen erwies. Dies resultierte in zwei verschiedenen Absorptionsbanden, wobei nicht klar war, welche die mit dem korrekt eingebauten Retinal war. Beide Banden wurden in Ultrakurzzeitexperimenten angeregt, hierbei stellte sich heraus, dass die bathochrom verschobene Spezies das korrekt eingebaute Retinal besitzt, da diese auch eine Schwingungsfineinstruktur, wie auch der Wildtyp, zeigt. Das *trans*-locked Retinal kann ChR2 erfolgreich an der Isomerisierung hindern

und zeigt nach dem Zerfall des angeregten Zustandes keine Photoprodukt-Bildung. Bei dem zweiten Retinalprotein, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, handelt es sich um *Krokinobacter eikaustus* rhodopsin 2 (Kapitel 5). Zuerst wird in Abschnitt 5.2 die Primärreaktion des Proteins untersucht. Diese wurde unter verschiedenen Salzbedingungen, welche wichtig für die spätere Funktion des Proteins sind, jedoch auch Einfluss auf die Ultrakurzzeitdynamik des Proteins nehmen, analysiert (Unterabschnitt 5.2.1). Der angeregte Zustand des Proteins zerfällt biexponentiell, wobei die erste Komponente den reaktiven Pfad und die langsamere Komponente den nicht-reaktiven Pfad beschreibt. Der reaktive Pfad bildet innerhalb einiger hundert Femtosekunden das bathochrom verschobene, isomerisierte J Intermediat, welches durch Kühlprozesse auf der unteren Pikosekundenzeitskala in das K Intermediat übergeht. Beim nicht-reaktiven Pfad zerfällt der angeregte Zustand innerhalb einiger Pikosekunden und geht in den Grundzustand über, ohne dass eine Isomerisierung des Retinals stattfindet. Sind Na^+ oder K^+ Ionen in der Lösung anwesend, sind diese Prozesse gleich schnell. In Abwesenheit dieser Ionen wird der nicht-reaktive Pfad stärker populiert und zerfällt langsamer. Das gleiche salzabhängige Verhalten konnte in Unterabschnitt 5.2.2 mit der Mutante H30A gezeigt werden. Die Aminosäure H30 sitzt im Interface zweier Oligomere in der Nähe der extrazellulären Na^+ Bindestelle. Durch die Mutation von Histidin zu Alanin, wird das Protein fast ausschließlich zu einer Na^+ -Pumpe und pumpt kaum noch Protonen. Die Ultrakurzzeitdynamik bleibt jedoch unbeeinflusst davon und unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. Neben dem normalen all-*trans* Retinal wurden auch hier, wie schon für Channelrhodopsin 2, Retinalanaloga im Wildtyp untersucht, hier hauptsächlich unter dem Aspekt der Farbanpassung. Die hier verwendeten Analoga waren das A2 Retinal und das MMA Retinal (MMAR), die beide durch die Erweiterung des π -Systems zum Grundzustand rotverschobene Absorptionsspektren aufweisen. Das A2 Retinal besitzt eine weitere Doppelbindung und das MMAR zwei weitere Doppelbindungen im β -Jonen Ring im Vergleich zum Retinal. Das MMAR hat zusätzlich noch eine weitere Methylamino-Gruppe. Durch das größere π -System hat das MMAR auch die größere Rotverschiebung im Spektrum. Beide Retinalanaloga zeigen sehr breite ESA Banden und isomerisieren nur zu einem geringen Prozentsatz, die Hauptpopulation der angeregten Moleküle geht über den nicht-reaktiven

Pfad zurück in den Grundzustand.

Der Photozyklus von KR2 wurde in Abschnitt 5.3 untersucht. Hierbei wird unter anderem das Verhalten des Proteins unter verschiedenen pH- und Salzbedingungen analysiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Dynamik des Natrium-Pump-Zyklus unabhängig vom pH Wert ist. In einem pH Bereich zwischen 6 und 9.5 ändern sich die Lebenszeiten des Zyklus nicht signifikant, jedoch wird die Amplitude des O Intermediats, welches als Indikator für den (nicht Protonen) Ionentransport genutzt wird, bei niedrigem pH Wert geringer. Die geringere Amplitude weist auf einen geringeren Na^+ -Transport hin. Dies liegt an der Konkurrenz der zu transportierenden Ionen, in diesem Fall Na^+ und H^+ . Ist die H^+ Konzentration viel höher als die Na^+ Konzentration, so fängt das Protein an H^+ zu pumpen. Unter physiologischen Bedingungen handelt es sich bei KR2 jedoch um eine reine Na^+ -Pumpe. Sind Kalium-Ionen bei pH 9.5 anwesend, so zeigt das Protein wie auch beim Natrium-Pump-Zyklus ein starkes O Intermediat, was darauf hindeutet, dass auch K^+ transportiert werden kann. Dies konnte von Dr. Janina Sörmann (Arbeitsgruppe Bamberg, MPI für Biophysik Frankfurt) auch in elektrophysiologischen Messungen gezeigt werden. Bisher wurde in der Literatur davon ausgegangen, dass K^+ vom Wildtyp nicht transportiert werden kann. Um die Photozyklusdynamik des Natrium-Pumpzyklus besser verstehen zu können, wurde die Temperaturabhängigkeit des Photozyklus in Unterabschnitt 5.3.4 mit Hilfe der *Target Analysis* untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass das simple sequentielle Modell $\text{K} \rightarrow \text{L} \rightarrow \text{M} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{GS}$ die besten Fitresultate liefert, obwohl viele verschiedene Modelle mit Verzweigungen oder Rückraten ebenfalls getestet wurden. Resultat der *Target Analysis* sind unter anderem die *Evolution Associated Difference Spectra* (EADS). Diese beinhalten die Differenzspektren der einzelnen Zustände, welche um das Grundzustandsbleichen korrigiert werden können, um die *Evolution Associated Spectra* (EAS) zu bilden. Durch Entfaltung dieser EAS (auf der Energieskala) konnten die Reinspektren der einzelnen Photointermediate K, L, M und O berechnet werden. Auffällig hierbei war, dass das M Intermediat eine geringere Blauverschiebung als erwartet aufwies, was höchstwahrscheinlich an der Elektrostatik in der Retinal-Bindetasche liegt. Durch die Entfaltung der Spektren konnten ebenfalls die Gleichgewichte, welche zu schnell sind, um in der *Target Analysis* aufgelöst zu werden, bestimmt werden. Die K, L und M Intermediate ste-

hen, je nach Temperatur, in verschiedenen Gleichgewichten zueinander, während das O Intermediat, keine Gleichgewichte eingeht und nur separiert von den anderen Intermediaten auftaucht. Dies bedeutet, dass sich zwischen M und O Intermediat ein unidirektionaler Schritt im Photozyklus befinden muss. Dieser hängt wahrscheinlich mit dem Na^+ -Transport zusammen, da das Ion beim Übergang vom M zum O aufgenommen und an der Schiffbase vorbei transportiert werden muss.

Um den Photozyklus besser untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Anlage zur transienten Blitzlichtphotolyse aufgebaut und die bestehende Breitband-Blitzlichtphotolyse automatisiert und verbessert. Hierfür wurden mithilfe von MATLAB und LABVIEW verschiedene Programme zur Datenakquisition, -verarbeitung und -analyse geschrieben. Für die transiente Blitzlichtphotolyse musste ein Datenreduzierungsprogramm entwickelt werden, um die mehrere Gigabyte großen Datensätze auf eine verarbeitbare Größe, mit gleichzeitiger Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, zu bringen. In der Breitband-Blitzlichtphotolyse konnte ein Pulsverzögerungsgenerator als zentrale Steuereinheit aller Komponenten der Breitband-Blitzlichtphotolyse eingesetzt und programmiert werden, um das Messverfahren zu automatisieren. Anschließend musste noch ein neues Datenverarbeitungsprogramm geschrieben werden, welches die Daten für die anschließende Analyse zusammenstellt und vorbereitet. Die neuen Programme gewähren einen reibungslosen Anschluss an die Analysesoftware OPTIMUS, welche in der Arbeitsgruppe genutzt wird.

Literaturverzeichnis

- [1] B. Röder. *Einführung in die molekulare Photobiophysik*. Teubner Verlag **1999**.
- [2] H. Haken und H. C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer **1997**.
- [3] J. M. Hollas. *Moderne Methoden in der Spektroskopie*. Vieweg **1995**.
- [4] J. M. Beechen und M. Ameloot. *Global and Target Analysis of Complex Decay Phenomena. Instrumentation Science & Technology* **1985**. 14(3-4), 379–402.
- [5] I. H. Van Stokkum, D. S. Larsen und R. Van Grondelle. *Global and target analysis of time-resolved spectra. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **2004**. 1657(2-3), 82–104.
- [6] A. R. Holzwarth. *Data Analysis of Time-Resolved Measurements*. In *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, Bd. 3 **1996**. S. 75–91.
- [7] C. Ruckebusch, M. Sliwa, P. Pernot, A. de Juan und R. Tauler. *Comprehensive data analysis of femtosecond transient absorption spectra: A review. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2012**. 13(1), 1–27.
- [8] G. Landl, T. Langthaler, H. W. Engl und H. F. Kauffmann. *Distribution of event times in time-resolved fluorescence: The exponential series approach-algorithm, regularization, analysis. Journal of Computational Physics* **1991**. 95(1), 1–28.
- [9] R. Croce, M. G. Müller, R. Bassi und A. R. Holzwarth. *Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major light-harvesting complex*

- (LHCII) of higher plants. I. Femtosecond transient absorption measurements. *Biophysical Journal* **2001**. 80(2), 901–915.
- [10] C. Slavov, H. Hartmann und J. Wachtveitl. *Implementation and Evaluation of Data Analysis Strategies for Time-Resolved Optical Spectroscopy*. *Analytical Chemistry* **2015**. 87(4), 2328–2336.
- [11] A. Siemiarczuk, B. D. Wagner und W. R. Ware. *Comparison of the maximum entropy and exponential series methods for the recovery of distributions of lifetimes from fluorescence lifetime data*. *Journal of Physical Chemistry* **1990**. 94(4), 1661–1666.
- [12] A. N. Tikhonov. *Solution of Ill-posed Problems*. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1963**. 151, 501–504.
- [13] C. L. Slavov. *On the ultrafast kinetics of the energy and electron transfer reactions in Photosystem I*. Dissertation, Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie Mühlheim an der Ruhr **2009**.
- [14] J. L. Spudich, C.-S. Yang, K.-H. Jung und E. N. Spudich. *Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2000**. 16(1), 365–392.
- [15] O. P. Ernst, D. T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L. S. Brown und H. Kandori. *Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms*. *Chemical Reviews* **2014**. 114(1), 126–163.
- [16] H. Kandori. *Ion-pumping microbial rhodopsins*. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2015**. 2(52), 1–11.
- [17] J. Soppa. *Two hypotheses - one answer. Sequence comparison does not support an evolutionary link between halobacterial retinal proteins including bacteriorhodopsin and eukaryotic G-protein-coupled receptors*. *FEBS Letters* **1994**. 342(1), 7–11.

- [18] D. Oesterhelt und W. Stoeckenius. *Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium*. *Nature New Biology* **1971**. 233, 149–152.
- [19] A. Matsuno-Yagi und Y. Mukohata. *Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1977**. 78(1), 237–243.
- [20] J. L. Spudich und R. A. Bogomolni. *Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin*. *Nature* **1984**. 312(6), 509–513.
- [21] K. W. Foster, J. Saranak, N. Patel, G. Zarilli, M. Okabe, T. Kline und K. Nakanishi. *A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote Chlamydomonas*. *Nature* **1984**. 311(5988), 756–759.
- [22] M. Beckmann und P. Hegemann. *In Vitro Identification of Rhodopsin in the Green Alga Chlamydomonas*. *Biochemistry* **1991**. 30(15), 3692–3697.
- [23] P. Hegemann, W. Gärtner und R. Uhl. *All-trans retinal constitutes the functional chromophore in Chlamydomonas rhodopsin*. *Biophysical journal* **1991**. 60(6), 1477–1489.
- [24] P. Hegemann und H. Harz. *Rhodopsin-regulated calcium currents in Chlamydomona*. *Nature* **1991**. 351(6326), 489–491.
- [25] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg und P. Hegemann. *Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae*. *Science* **2002**. 296(5577), 2395–2398.
- [26] J. Y. Lin, M. Z. Lin, P. Steinbach und R. Y. Tsien. *Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics*. *Biophysical Journal* **2009**. 96(5), 1803–1814.
- [27] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann und E. Bamberg. *Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel*. *PNAS* **2003**. 100(24), 13940–13945.

- [28] F. Zhang, J. Vierock, O. Yizhar, L. E. Fenno, S. Tsunoda, A. Kianianmomeni, M. Prigge, A. Berndt, J. Cushman, J. Polle, J. Magnuson, P. Hegemann und K. Deisseroth. *The microbial opsin family of optogenetic tools. Cell* **2011**. *147*(7), 1446–1457.
- [29] O. B ej a, 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 und E. F. DeLong. *Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. Science* **2000**. *289*(5486), 1902–1906.
- [30] O. M. Finkel, O. B ej a und S. Belkin. *Global abundance of microbial rhodopsins. ISME Journal* **2013**. *7*(2), 448–451.
- [31] A. K. Sharma, O. Zhaxybayeva, R. T. Papke und W. F. Doolittle. *Actinorhodopsins: Proteorhodopsin-like gene sequences found predominantly in non-marine environments. Environmental Microbiology* **2008**. *10*(4), 1039–1056.
- [32] N. Atamna-Ismaeel, G. Sabehi, I. Sharon, K. P. Witzel, M. Labrenz, K. J urgens, T. Barkay, M. Stomp, J. Huisman und O. Beja. *Widespread distribution of proteorhodopsins in freshwater and brackish ecosystems. ISME Journal* **2008**. *2*(6), 656–662.
- [33] L. C. Bohorquez, C. A. Ruiz-P erez und M. M. Zambrano. *Proteorhodopsin-like genes present in thermoacidophilic high-mountain microbial communities. Applied and Environmental Microbiology* **2012**. *78*(21), 7813–7817.
- [34] L. E. Petrovskaya, E. P. Lukashev, V. V. Chupin, S. V. Sychev, E. N. Lyukmanova, E. A. Kryukova, R. H. Ziganshin, E. V. Spirina, E. M. Rivkina, R. A. Khatypov, L. G. Erokhina, D. A. Gilichinsky, V. A. Shuvalov und M. P. Kirpichnikov. *Predicted bacteriorhodopsin from Exiguobacterium sibiricum is a functional proton pump. FEBS Letters* **2010**. *584*(19), 4193–4196.
- [35] D. Man, W. Wang, G. Sabehi, L. Aravind, A. F. Post, R. Massana, E. N. Spudich, J. L. Spudich und O. Beja. *Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. EMBO J.* **2003**. *22*(8), 1725–1731.

- [36] K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure und H. Kandori. *A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. Nature communications* **2013**. *4*, 1678.
- [37] S. Yoshizawa, Y. Kumagai, H. Kim, Y. Ogura, T. Hayashi, W. Iwasaki, E. F. DeLong und K. Kogure. *Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria. PNAS* **2014**. *111*(18), 6732–6737.
- [38] S. P. Balashov, E. S. Imasheva, A. K. Dioumaev, J. M. Wang, K. H. Jung und J. K. Lanyi. *Light-driven Na⁺ pump from Gillisia limnaea: A high-affinity Na⁺ binding site is formed transiently in the photocycle. Biochemistry* **2014**. *53*(48), 7549–7561.
- [39] Y. V. Bertsova, A. V. Bogachev und V. P. Skulachev. *Proteorhodopsin from Dokdonia sp. PRO95 is a light-driven Na⁺-pump. Biochemistry* **2015**. *80*(4), 449–454.
- [40] S. K. Kwon, B. K. Kim, J. Y. Song, M. J. Kwak, C. H. Lee, J. H. Yoon, T. K. Oh und J. F. Kim. *Genomic makeup of the marine flavobacterium Nonlabens (Donghaeana) dokdonensis and identification of a novel class of rhodopsins. Genome Biology and Evolution* **2013**. *5*(1), 187–199.
- [41] L. Fenno, O. Yizhar und K. Deisseroth. *The Development and Application of Optogenetics. Annu Rev Neurosci.* **2011**. *34*, 389–412.
- [42] E. G. Govorunova, Sineshchekov und J. L. Spudich. *Three Families of Channelrhodopsins and Their Use in Optogenetics (review). Neuroscience and Behavioral Physiology* **2019**. *49*(2), 163–168.
- [43] G. Nagel, M. Brauner, J. F. Liewald, N. Adeishvili, E. Bamberg und A. Gottschalk. *Light activation of Channelrhodopsin-2 in excitable cells of Caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses. Current Biology* **2005**. *15*(24), 2279–2284.

- [44] X. Li, D. V. Gutierrez, M. G. Hanson, J. Han, M. D. Mark, H. Chiel, P. Hegemann, L. T. Landmesser und S. Herlitze. *Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin*. *PNAS* **2005**. 102(49), 17816–17821.
- [45] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel und K. Deisseroth. *Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity*. *Nature Neuroscience* **2005**. 8(9), 1263–1268.
- [46] T. Ishizuka, M. Kakuda, R. Araki und H. Yawo. *Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels*. *Neuroscience Research* **2006**. 54(2), 85–94.
- [47] A. Bi, J. Cui, Y. P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A. M. Dizhoor und Z.-H. Pan. *Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration*. *Neuron*. **2006**. 50(1), 23–33.
- [48] H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, S. Hososhima, T. Ishizuka, M. R. Hoque, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori und O. Nureki. *Structural basis for Na^+ transport mechanism by a light-driven Na^+ pump*. *Nature* **2015**. 521(7550), 48–53.
- [49] G. Porter. *Flash photolysis and spectroscopy. A new method for the study of free radical reactions*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* **1950**. 200(1061), 284–300.
- [50] J. E. Geusic, H. M. Marcos und L. G. Van Uitert. *Laser Oscillations in Nd-doped Yttrium Aluminum, Yttrium Gallium and Gadolinium Garnets*. *Applied Physics Letters* **1964**. 4(10), 182–184.
- [51] J. A. Koningstein und J. E. Geusic. *Energy Levels and Crystal-Field Calculations of Neodymium in Yttrium Aluminum Garnet*. *Physical Review* **1964**. 136(3A), 711–716.

- [52] P. Eberhardt. *Development of a spectrally resolved flash photolysis experiment and first measurements on microbial rhodopsins* **2014**.
- [53] P. Instruments. *PI-MAX 3 System* **2013**.
- [54] D. Göttbauer. *Implementierung eines Blitzlichtphotolyse-Datenaquisitionsprogramms zur zeitaufgelösten Analyse von mikrobiellen Rhodopsinen* **2016**.
- [55] T. Wilhelm, J. Piel und E. Riedle. *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter*. *Optics Letters* **1997**. 22(19), 1494.
- [56] O. Volkov, K. Kovalev, V. Polovinkin, V. Borshchevskiy, C. Bamann, R. Astashkin, E. Marin, A. Popov, T. Balandin, D. Willbold, G. Büldt, E. Bamberg und V. Gordeliy. *Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2*. *Science* **2017**. 358(6366), eaan8862.
- [57] H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth und O. Nureki. *Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel*. *Nature* **2012**. 482(7385), 369–374.
- [58] M.-K. Verhoeven, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg und J. Wachtveitl. *The photocycle of channelrhodopsin-2: ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps*. *Chemphyschem* **2010**. 11(14), 3113–3122.
- [59] V. A. Lórenz-Fonfría und J. Heberle. *Channelrhodopsin unchained: Structure and mechanism of a light-gated cation channel*. *Biochimica et biophysica acta* **2014**. 1837(5), 626–642.
- [60] M.-K. Neumann-Verhoeven, K. Neumann, C. Bamann, I. Radu, J. Heberle, E. Bamberg und J. Wachtveitl. *Ultrafast infrared spectroscopy on channelrhodopsin - 2 reveals efficient energy transfer from the retinal chromophore to the protein*. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**. 135(18), 6968–6976.

- [61] E. Bühl, P. Eberhardt, C. Bamann, E. Bamberg, M. Braun und J. Wachtveitl. *Ultrafast Protein Response in Channelrhodopsin-2 Studied by Time-Resolved IR Spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry Letters* **2018**, acs.jpcllett.8b03382.
- [62] E. Kölling, W. Gärtner, D. Oesterhelt und L. Ernst. *Sterically Fixed retinal-Analogue Prevents Proton-Pumping Activity in Bacteriorhodopsin. Angewandte Chemie - International Edition* **1984**. 23(I), 81–82.
- [63] H. Polland, M. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling und D. Oesterhelt. *Optical picosecond studies of bacteriorhodopsin containing a sterically fixed retinal. Biochemica et Biophysica Acta* **1984**. 767, 635–639.
- [64] E. Bühl. *Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen zur Aufklärung der Photoreaktionen mikrobieller Rhodopsine*. Dissertation, Goethe Universität Frankfurt **2017**.
- [65] T. Resler, B.-J. Schultz, V. A. Lórenz-Fonfría, R. Schlesinger und J. Heberle. *Kinetic and Vibrational Isotope Effects of Proton Transfer Reactions in Channelrhodopsin-2. Biophysical Journal* **2015**. 109(2), 287–297.
- [66] J. K. Delaney, T. L. Brack, G. H. Atkinson, M. Otrolenghi, G. Steinberg und M. Sheves. *Primary picosecond molecular events in the photoreaction of the BR5.12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**. 92(March), 2101–2105.
- [67] R. Gross, C. Schumann, M. M. N. Wolf, J. Herbst, R. Diller, N. Friedman und M. Sheves. *Ultrafast protein conformational alterations in bacteriorhodopsin and its locked analogue BR5.12. The journal of physical chemistry. B* **2009**. 113(22), 7851–60.
- [68] K. Inoue, M. Konno, R. Abe-Yoshizumi und H. Kandori. *The Role of the NDQ Motif in Sodium-Pumping Rhodopsins. Angewandte Chemie - International Edition* **2015**. 54(39), 11536–11539.
- [69] I. Gushchin, V. Shevchenko, V. Polovinkin, K. Kovalev, A. Alekseev, E. Round, V. Borshchevskiy, T. Balandin, A. Popov, T. Gensch, C. Fahlke, C. Bamann,

- D. Willbold, G. Büldt, E. Bamberg und V. Gordeliy. *Crystal structure of a light-driven sodium pump. Nature Structural & Molecular Biology* **2015**. (April).
- [70] K. Kovalev, V. Polovinkin, I. Gushchin, A. Alekseev, V. Shevchenko, V. Borshevskiy, R. Astashkin, T. Balandin, D. Bratanov, S. Vaganova, A. Popov, V. Chupin, G. Büldt, E. Bamberg und V. Gordeliy. *Structure and mechanisms of sodium-pumping KR2 rhodopsin. Science Advances* **2019**. 5, 1–10.
- [71] S. Tahara, S. Takeuchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Inoue, H. Ohtani, H. Kandori und T. Tahara. *Ultrafast Photoreaction Dynamics of a Light-Driven Sodium-Ion-Pumping Retinal Protein from Krokobacter eikastus Revealed by Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectroscopy. Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**. 6(22), 4481–4486.
- [72] Y. Hontani, K. Inoue, M. Kloz, Y. Kato, H. Kandori und J. T. M. Kennis. *The photochemistry of sodium ion pump rhodopsin observed by watermarked femto- to submillisecond stimulated Raman spectroscopy. Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**. 18(35), 24729–24736.
- [73] M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling und D. Oesterhelt. *Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin. Chemical Physics Letters* **1985**. 117(1), 1–7.
- [74] S. Tahara, S. Takeuchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Inoue, H. Ohtani, H. Kandori und T. Tahara. *Origin of the Reactive and Nonreactive Excited States in the Primary Reaction of Rhodopsins: pH Dependence of Femtosecond Absorption of Light-Driven Sodium Ion Pump Rhodopsin KR2. J. Phy. Chem. B* **2018**. 122(18), 4784–4792.
- [75] H. Kandori, K. Yoshihara, H. Tomioka und H. Sasabe. *Primary photochemical events in halorhodopsin studied by subpicosecond time-resolved spectroscopy. Journal of Physical Chemistry* **1992**. 96(14), 6066–6071.
- [76] R. Huber, T. Köhler, M. O. Lenz, E. Bamberg, R. Kalmbach, M. Engelhard

- und J. Wachtveitl. *pH-dependent photoisomerization of retinal in proteorhodopsin*. *Biochemistry* **2005**. *44*(6), 1800–1806.
- [77] T. Nakamura, S. Takeuchi, M. Shibata, M. Demura, H. Kandori und T. Tahara. *Ultrafast pump-probe study of the primary photoreaction process in pharaonis halorhodopsin: Halide ion dependence and isomerization dynamics*. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**. *112*(40), 12795–12800.
- [78] M. O. Lenz, R. Huber, B. Schmidt, P. Gilch, R. Kalmbach, M. Engelhard und J. Wachtveitl. *First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin*. *Biophysical journal* **2006**. *91*(1), 255–262.
- [79] K. Inoue, H. Ono und H. Kandori. *Na⁺ Transport by a Sodium Ion Pump Rhodopsin is Resistant to Environmental Change: A Comparison of the Photocycles of the Na⁺ and Li⁺ Transport Processes*. *Chemistry Letters* **2015**. *44*(3), 294–296.
- [80] J. Kaur, C. N. Kriebel, P. Eberhardt, O. Jakdetchai, A. J. Leeder, I. Weber, L. J. Brown, R. C. Brown, J. Becker-Baldus, C. Bamann, J. Wachtveitl und C. Glaubitz. *Solid-state NMR analysis of the sodium pump *Krokinobacter rhodopsin 2* and its H30A mutant*. *Journal of Structural Biology* **2018**. *206*(1), 55–65.
- [81] C.-M. Suomivuori, A. P. Gamiz-Hernandez, D. Sundholm und V. R. I. Kaila. *Energetics and dynamics of a light-driven sodium-pumping rhodopsin*. *PNAS* **2017**. *114*(27), 7043–7048.
- [82] T. Kouyama, T. Nishikawa, T. Tokuhisa und H. Okumura. *Crystal Structure of the L Intermediate of Bacteriorhodopsin: Evidence for Vertical Translocation of a Water Molecule during the Proton Pumping Cycle*. *Journal of Molecular Biology* **2004**. *335*(2), 531–546.
- [83] F. Tokunaga, T. Ebrey und F. Tokunaga. *The Blue Membrane: The 3-Dehydroretinal-Based Artificial Pigment of the Purple Membrane*. *Biochemistry* **1978**. *17*(10), 1915–1922.

- [84] O. A. Sineshchekov, E. G. Govorunova, J. Wang und J. L. Spudich. *Enhancement of the long-wavelength sensitivity of optogenetic microbial rhodopsins by 3,4-dehydroretinal*. *Biochemistry* **2012**. 51(22), 4499–4506.
- [85] E. Smolensky und M. Sheves. *Retinal-salinixanthin interactions in xanthorhodopsin: A circular dichroism (CD) spectroscopy study with artificial pigments*. *Biochemistry* **2009**. 48(34), 8179–8188.
- [86] S. Ganapathy, H. Venselaar, Q. Chen, H. J. M. De Groot, K. J. Hellingwerf und W. J. De Grip. *Retinal-Based Proton Pumping in the Near Infrared*. *Journal of the American Chemical Society* **2017**. 139(6), 2338–2344.
- [87] A. Shigeta, S. Ito, R. Kaneko, S. Tomida, K. Inoue, H. Kandori und I. Kawamura. *Long-distance perturbation on Schiff base-counterion interactions by His30 and the extracellular Na⁺-binding site in: Krokinobacter rhodopsin 2*. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**. 20(13), 8450–8455.
- [88] H. Kandori, K. Inoue und S. P. Tsunoda. *Light-Driven Sodium-Pumping Rhodopsin: A New Concept of Active Transport*. *Chemical Reviews* **2018**, acs.chemrev.7b00548.
- [89] Y. Kato, K. Inoue und H. Kandori. *Kinetic Analysis of H⁺ -Na⁺ Selectivity in a Light-Driven Na⁺ -Pumping Rhodopsin*. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**. 6(24), 5111–5115.
- [90] K. Inoue, Y. Kato und H. Kandori. *Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria*. *Trends in Microbiology* **2015**. 23(2), 91–98.
- [91] A. Vogt, A. Silapetere, C. Grimm, F. Heiser, M. Ancina Möller und P. Hegemann. *Engineered Passive Potassium Conductance in the KR2 Sodium Pump*. *Biophysical Journal* **2019**. 116(10), 1941–1951.
- [92] J. Sörmann. *Ionentransport in Krokinobacter Eikastus Rhodopsin-2*. Dissertation, MPI für Biophysik Frankfurt **2019**.

- [93] M. Konno, Y. Kato, H. E. Kato, K. Inoue, O. Nureki und H. Kandori. *Mutant of a Light-Driven Sodium Ion Pump Can Transport Cesium Ions. The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**. 7(1), 51–55.
- [94] K. Mörs, C. Roos, F. Scholz, J. Wachtveitl, V. Dötsch, F. Bernhard und C. Glaubitz. *Modified lipid and protein dynamics in nanodiscs. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2013**. 1828(4), 1222–1229.
- [95] I. G. Denisov und S. G. Sligar. *Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. Nature Structural and Molecular Biology* **2016**. 23(6), 481–486.
- [96] E. Henrich, J. Sörmann, P. Eberhardt, O. Peetz, J. Mezhyrova, N. Morgner, K. Fendler, V. Dötsch, J. Wachtveitl, F. Bernhard und C. Bamann. *From Gene to Function: Cell-free Electrophysiological and Optical Analysis of Ion Pumps in Nanodiscs. Biophysical Journal* **2017**. 113(6), 1331–1341.
- [97] E. Bühl, M. Braun, A. Lakatos, C. Glaubitz und J. Wachtveitl. *Fluorescence and excited state dynamics of the deprotonated Schiff base retinal in proteorhodopsin. Biological Chemistry* **2015**. 396(9-10), 1109–1115.
- [98] G. Varo, L. S. Brown, M. Lakatos und J. K. Lanyi. *Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. Biophys. J* **2003**. 84(2), 1202–1207.
- [99] H. Gustmann. *Zeitaufgelöste Charakterisierung struktureller Änderungen von spezifisch modifizierter RNA*. Dissertation, Goethe Universität Frankfurt **2018**.
- [100] J. Becker-Baldus, C. Bamann, K. Saxena, H. Gustmann, L. J. Brown, R. C. D. Brown, C. Reiter, E. Bamberg, J. Wachtveitl, H. Schwalbe und C. Glaubitz. *Enlightening the photoactive site of channelrhodopsin-2 by DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy. PNAS* **2015**. 112(32), 201507713.
- [101] M. Asido, P. Eberhardt, C. N. Kriebel, M. Braun, C. Glaubitz und J. Wachtveitl. *Time-resolved IR spectroscopy reveals mechanistic details of ion transport*

- in the sodium pump: Krokinobacter eikastus rhodopsin 2. Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**. *21*(8), 4461–4471.
- [102] I. H. Van Stokkum und R. H. Lozier. *Target analysis of the bacteriorhodopsin photocycle using a spectrotemporal model. Journal of Physical Chemistry B* **2002**. *106*(13), 3477–3485.
- [103] H. F. Chen, K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, A. Wada und H. Kandori. *Time-resolved FTIR study of light-driven sodium pump rhodopsins. Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**. *20*(26), 17694–17704.
- [104] N. Nishimura, M. Mizuno, H. Kandori und Y. Mizutani. *Distortion and a Strong Hydrogen Bond in the Retinal Chromophore Enable Sodium Ion Transport by the Sodium Ion Pump KR2. The Journal of Physical Chemistry B* **2019**, acs.jpcc.9b00928.
- [105] U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg und D. Oesterhelt. *General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: The isomerization/switch/transfer (IST) model. Biochemistry* **1997**. *36*(1), 2–7.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Bereiche des elektromagnetischen Spektrums.	6
2.2	Isomerisierung von Typ I und Typ II Retinal.	14
2.3	Verschiedene Funktionen von Rhodopsinen.	17
3.1	Aufbau einer ICCD Kamera.	23
3.2	Schematischer Aufbau der Breitband Blitzlichtphotolyse.	24
3.3	Schematischer Aufbau der transienten Blitzlichtphotolyse.	26
3.4	Graphische Oberfläche des Blitzlichtphotolyse Pulsverzögerungsprogramms.	29
3.5	Puls Schema für das Triggern der verschiedenen Geräte.	30
3.6	GUI des Programms ICCD Combine.	32
3.7	GUI des Programms für die Datenreduktion.	36
3.8	Schematischer Aufbau des ultraschnellen transienten Absorptionsaufbaus.	39
4.1	Photozyklus und Struktur von ChR2.	44
4.2	Struktur des 9,12-Phenylretinal.	46
4.3	Absorptionsspektrum des 9,12-Phenylretinal.	47
4.4	Photozyklus des 9,12-Phenylretinal.	48
4.5	Struktur des trans-locked Retinals.	49
4.6	Absorptionsspektrum trans-locked Retinal.	50
4.7	Ultrakurzzeitmessung an ChR2 mit <i>trans</i> -locked Retinal, angeregt bei 387 nm.	50
4.8	Ultrakurzzeitmessung an ChR2 mit <i>trans</i> -locked Retinal, angeregt bei 510 nm.	52

5.1	Struktur von KR2.	56
5.2	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung des KR2 WT mit NaCl.	58
5.3	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung des KR2 WT mit KCl.	59
5.4	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung des KR2 WT ohne Salz.	60
5.5	Ultrakurzzeittransienten des KR2 WT ohne Salz.	61
5.6	477 nm Transienten des KR2 WT bei verschiedenen Salzbedingungen.	62
5.7	Absorptionsspektren des KR2 WT und der H30A Mutante	63
5.8	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung der KR2 Mutante H30A mit NaCl.	64
5.9	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung der KR2 Mutante H30A ohne Salz.	65
5.10	477 nm Transienten der KR2 H30A Mutante bei verschiedenen Salzbedingungen.	65
5.11	Absorptionsspektren des KR2 WT und der L120Q Mutante	66
5.12	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung der KR2 Mutante L120Q mit NaCl.	67
5.13	Zeitschnitte der Ultrakurzzeitmessung der KR2 Mutante L120Q mit NaCl.	67
5.14	Struktur des A2 Retinals.	68
5.15	Absorptionsspektrum A2 Retinals.	69
5.16	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit A2 Retinal und NaCl.	70
5.17	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit A2 Retinal ohne Salz.	70
5.18	Struktur des MMAR Retinals.	71
5.19	Absorptionsspektrum MMAR in KR2.	72
5.20	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit MMAR und NaCl.	72
5.21	Zeitschnitte der der Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit MMAR und NaCl.	73
5.22	Zeitaufgelöste Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit MMAR ohne Salz.	74
5.23	Zeitschnitte der der Ultrakurzzeitmessung von KR2 mit MMAR ohne Salz.	74

5.24	Schema der primären Photoreaktion des KR2 Wildtyps	75
5.25	KR2 Photozyklus in Detergenz.	79
5.26	Blitzlichtphotolyse von KR2 bei pH 8.5 bei verschiedenen Salzbedin- gungen.	81
5.27	Blitzlichtphotolyse von KR2 bei pH 9.5 bei verschiedenen Salzbedin- gungen.	82
5.28	Blitzlichtphotolyse von KR2 bei pH 6 bei verschiedenen Salzbedin- gungen.	83
5.29	Absorptionsspektren KR2 in Detergenz, Liposomen und Nanodisks.	85
5.30	Blitzlichtphotolyse Messung von KR2 in Nanodisk mit 50 mM NaCl und pH 8.5.	86
5.31	Temperaturabhängige Blitzlichtphotolysemessung von KR2 WT.	87
5.32	LDMS berechnet aus den temperaturabhängigen Blitzlichtphotolyse- daten.	88
5.33	Wellenlängenabhängigkeit der KR2 Flashphotolysemessungen.	89
5.34	Eyring-Plot der Temperaturabhängigkeit von KR2.	90
5.35	Transiente Populationen des KR2 Photozyklus.	92
5.36	EADS der verschiedenen Photozyklusintermediate bei verschiedenen Temperaturen.	93
5.37	EAS der verschiedenen Photozyklusintermediate bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit der Wellenlänge.	95
5.38	EAS der verschiedenen Photozyklusintermediate bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit der Wellenzahl (Energieskala).	95
5.39	Spektrale Entfaltung der EAS bei 20 °C.	96
5.40	Reinspektren der KR2 Photointermediate.	97
5.41	Gleichgewichte der Photointermediate in KR2 bei verschiedenen Tem- peraturen.	98
5.42	Tieftemperaturspektren von KR2 bei 110 und 160 K	100
5.43	Tieftemperaturspektren von KR2 bei 230 K und flashfreeze	101

Tabellenverzeichnis

5.1	Lebenszeiten von KR2 bei verschiedenen pH- und Salzbedingungen. . .	84
5.2	Energiebarrieren	91
5.3	Startwerte und Grenzen für den Fit der Streulichtkurve.	94
5.4	$\tilde{\nu}_{max}$ und Halbwertsbreiten für die gefitteten Gaussprofile der Photo- zyklusintermediate.	97

Abkürzungsverzeichnis

BR	Bacteriorhodopsin
HR	Halorhodopsin
SRI	Sensory Rhodopsin I
SRII	Sensory Rhodopsin II
ChR1	Channelrhodopsin 1
ChR2	Channelrhodopsin 2
KR2	<i>Krokinobacter eikastus</i> Rhodopsin 2
NaR	Sodium Pumping Rhodopsin
PR	Proteorhodopsin
GPR	green absorbing Proteorhodopsin
BPR	blue absorbing Proteorhodopsin
RSB	Retinal Schiff Base
MMAR	3-methylamino-16-nor-1,2,3,4-didehydroretinal
A2 Retinal	3,4-dehydroretinal
WT	Wildtyp
MSP	Membrane-Scaffold Protein

ICCD	Intensified Charge-Coupled Devices
CCD	Charge-Coupled Devices
Nd:YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
OPO	Optical Parametric Oscillator
PMT	Photomultiplier Tube
SHG	Second Harmonic Generation
THG	Third Harmonic Generation
BBO	β -Bariumborat
CPA	Chirped Pulse Amplification
CW	Continous Wave
UV	Ultraviolett
PZ	Pockels-Zelle
ROI	Region of Intrest
ATAS	Advanced Transient ABsorption Spectroscopy
NOPA	Noncollinear Optical Parametric Amplification
PSRB	Protonated Retinal Schiff Base
IRF	Instrument Response Function
DAS	Decay Associated Spectra
ESA	Excited State Absorption
GSB	Groundstate Bleach
SE	Stimulated Emission
GZ	Grundzustand

LDM	Lifetime Density Map
FTIR	Fourier Transform Infrarot
ATR	Attenuated Total Reflection
HOOP	Hydrogen Out Of Plane
FWHM	Full Width Half Maximum
SAS	Species Associated Spectrum
EAS	Evolution Associated Spectrum
EADS	Evolution Associated Difference Spectrum
SSM	Solid-Supported Membrane
LILBID	Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
DM	n-Decyl- β -maltopyranosid
DDM	Dodecyl- β -D-maltosid
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphorylglycerol
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-glycerol
NMG	N-Methyl-D-glucamin

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Peter Eberhardt, erkläre an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich diese, hier vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

„Molekulare Mechanismen in mikrobiellen Retinalproteinen“

selbstständig angefertigt und mich nicht anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen bedient habe. Insbesondere versichere ich, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind. Außerdem versichere ich, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ort, Datum

Unterschrift