

**Charakterisierung der Photoreaktion der
lichtgetriebenen Protonenpumpe Proteorhodopsin mit
IR-Spektroskopie
und die Entwicklung einer Methodik zur Untersuchung
von Carboxylierungsreaktionen am Beispiel von
RuBisCO**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von **Gabriela Schäfer**
geboren am 23. Oktober 1981 in Hanau

Frankfurt am Main 2009

(D 30)

vom Fachbereich Physik der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. D.H.Rischke

Gutachter: Prof. Dr. W. Mäntele
Prof. Dr. C. Glaubitz

Datum der Disputation:

Für Papa

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole	7
1 Zusammenfassung	9
2 Abstract	11
3 Einleitung	13
3.1 Biologische Systeme - Proteorhodopsin und RuBisCO	13
3.1.1 Retinalproteine	13
3.1.2 Proteorhodopsin - Grundlagen und biologische Relevanz	18
3.1.3 RuBisCO	21
3.1.3.1 Detaillierter Reaktionszyklus und Aktivierungsprozesse	23
3.2 Spektroskopische Methoden	26
3.2.1 Infrarotspektroskopie	26
3.2.2 IR-Spektrometer	31
3.2.2.1 Lichtquellen und Detektion	31
3.2.2.2 Probenhalter und Probenform	32
3.2.3 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie	33
3.2.4 Typische IR-Banden von Proteinen und Aminosäuren	35
3.2.5 Käfigverbindung zur gezielten Reaktionskontrolle	39
3.2.6 CD-Spektroskopie	40
3.3 Ziel der Arbeit	44
4 Material und Methoden	47
4.1 Enzympräparation	47
4.1.1 Herstellung der Proteorhodopsin-Proben	47
4.1.2 Herstellung der RuBisCO-Proben	47
4.2 Probenvorbereitung	48
4.3 Verwendete Spektrometer, Parameter und Datenanalyse	51
4.4 Material	56

5	Ergebnisse und Diskussion	58
5.1	Proteorhodopsin	58
5.1.1	Stabilität und Funktionalität von Proteorhodopsin 2D Kristallen .	58
5.1.1.1	Probencharakterisierung mit VIS- und IR-Spektroskopie	58
5.1.1.2	CD-Spektren und Temperaturstabilität	61
5.1.1.3	Der Photozyklus für PR2D Kristalle	65
5.1.2	Tiefemperatur FTIR Daten	70
5.1.2.1	K Intermediate für PR2D und PRrek	72
5.1.2.2	Photozyklus bei pH 9,0	75
5.1.2.3	Photozyklus bei pH 5,1	80
5.1.2.4	Der Einfluss kleiner pH-Änderungen auf den Photozyklus	88
5.1.3	Diskussion	91
5.2	Käfig-CO ₂ und RuBisCO	95
5.2.1	Nitrophenyllessigsäure als Käfig-CO ₂	95
5.2.1.1	Kurzzeit-IR-Spektroskopie	96
5.2.1.2	Freisetzung von CO ₂ und die pH-abhängige Hydrolyse	99
5.2.1.3	Katalysierte Hydratisierung von CO ₂	105
5.2.1.4	Doppeldifferenzspektren und pufferabhängige Banden	106
5.2.2	In situ Carbamatbildung	108
5.2.2.1	Reaktion von CO ₂ mit Diethylethanolamin	108
5.2.2.2	Reaktion von CO ₂ mit poly-Lysin	109
5.2.3	Aktivierung von RuBisCO	111
5.2.3.1	Die CO ₂ -Bande als Marker für die Aktivierung	112
5.2.3.2	Carbamatbildung im aktiven Zentrum	114
5.2.4	Diskussion	122
6	Ausblick	124
	Literaturverzeichnis	124
	Abbildungsverzeichnis	133

Abkürzungen und Symbole

Abs	Absorption
AcThDP	2-Acetyl-ThDP
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLM	Black Lipid Membrane
BR	Bacteriorhodopsin
BPR	blaues Proteorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
caged-CO ₂	meta-Nitrophenylacetat
CD	Circulardichroismus
DEA	Diethylethanolamin
DOPC	1,2-Di-oleoyl-glycero-phosphatidyl-choline
DTGS	deutერიertes Triglycinsulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
FT	Fourier-Transformation
FTIR	Fourier Transform Infrarot
Glu	Glutaminsäure
GPR	grünes Proteorhodopsin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HR	Halorhodopsin
IR	Infrarot
Käfig-CO ₂	meta-Nitrophenylacetat
Lys	Lysin
MCT	Quecksilber(mercury)-Cadmium-Tellurid
MPD	Methyl-2,4-Pentandiol
NaP _i	Natriumphosphatpuffer
NPAA	Nitrophenylacetat
PDB	Proteindatenbank
PR	Proteorhodopsin (in dieser Arbeit im experimentellen Teil synonym mit GPR)
PR2D	Proteorhodopsin 2D Kristalle

PRrek	rekonstituiertes Proteorhodopsin
PRsol	Detergens solubilisiertes Proteorhodopsin
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SRI	Sensor Rhodopsin I
S/R	Signal/Rausch
UZ	Ultrazentrifugation
VIS	sichtbarer ('visible') Spektralbereich
XR	Xantorhodopsin

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Systeme der biologischen Energiewandlung mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht und es wurden neue Erkenntnisse über die Funktion und Aktivierung der Proteine Proteorhodopsin und RuBisCO gewonnen. Zusätzlich konnte eine neue methodische Herangehensweise zur Untersuchung von Carboxylierungsreaktionen etabliert werden. Dieser Ansatz bietet in Zukunft breite Anwendungsmöglichkeiten zur Studie dieser biologisch so bedeutenden Reaktionsklasse.

Mit Hilfe der Infrarotspektroskopie und vor allem durch den Einsatz von Tieftemperaturmessungen konnte der bisher kontrovers diskutierte Photozyklus von Proteorhodopsin (PR) eingehend charakterisiert werden. Jenseits des gut verstandenen aktiven Transports bei pH 9,0 wurde vor allem der pH 5,1 Photozyklus untersucht. Erstmals konnte auch in Infrarotspektren das M-Intermediat bei pH 5,1 nachgewiesen werden. Dieses Intermediat ist von entscheidender Bedeutung für den aktiven Transport über die Zellmembran und seine Existenz wurde bisher vielfach angezweifelt. Zudem konnte Glu-108 als ein möglicher Protonenakzeptor des Photozyklus bei pH 5,1 identifiziert werden. Durch einen pH-Indikator ließ sich der Nachweis erbringen, dass auch im sauren pH-Bereich Protonen freigesetzt werden. Damit steht fest, dass ein aktiver Protonentransport bei pH 5,1 möglich ist. Zusammen mit Informationen zu protonierbaren Aminosäureseitenketten (vornehmlich Asp und Glu) lässt sich zudem mit Einschränkungen die These unterstützen, dass PR ober- und unterhalb des pK_a -Werts von Asp-97 in verschiedene Richtungen Protonen pumpt. Damit ergibt sich ein differenziertes Bild für den pH-abhängigen Photozyklus von PR mit drei pH-Bereichen (pH 9,0, 8,5 bis 5,5 und 5,1) in denen PR unterschiedliche Protonentransportwege zeigt.

Als weiteres biologischen System wurde RuBisCO genauer untersucht. Im Fokus der Arbeit war dabei die Aktivierung durch die Bildung eines Lysin-Carbamats im aktiven Zentrum. Obwohl RuBisCO das am häufigsten vorkommende Enzym unseres Planeten ist, in der Kohlenstofffixierung eine bedeutende Rolle spielt und obwohl mehrere Dutzend Kristallstrukturen existieren, gibt es noch immer genügend offe-

ne Fragen zur Aktivierung. Mit Hilfe eines Käfig-CO₂ konnte die Carbamatbildung im Enzym direkt verfolgt und der Einfluss von Magnesiumionen auf die Aktivierung beobachtet werden. Damit ließ sich ganz klar ausschließen, dass Magnesium bereits für die Carbamatbildung erforderlich ist. Die Koordination von Mg²⁺ ist erst für die Endiol-Bildung im weiteren Reaktionszyklus essentiell. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Azid eine Inhibierung des Enzyms durch die Konkurrenz mit CO₂ um die Bindungsstelle auslöst, allerdings verdrängt CO₂ das Azidion im Laufe der Zeit.

Mit den Ergebnissen für RuBisCO konnte klar gezeigt werden, dass die Kombination aus Käfig-CO₂ und Rapid-Scan IR-Spektroskopie ein völlig neues Feld für die Untersuchung von Carboxylierungsreaktionen eröffnet. Gerade die offenen Fragen zu Biotin bindenden Carboxylasen bieten ein breites Anwendungsgebiet für diese Methodik.

2 Abstract

In this work two enzymatic systems, which are part of the energy generating pathway of our ecosystem, were investigated using spectroscopic techniques. New insights into the function of Proteorhodopsin and the activation process of Ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase have been gained. In addition, a new approach for studying carboxylation reactions could be established and will be applicable for a broad range of problems.

The first part of this work concerns low-temperature IR-Studies of the PR photocycle at different pH-values. Whereas the pH 9,0 photocycle is well understood, the low pH photocycle is still controversially discussed and was therefore analyzed in detail. For the first time, the M-intermediate at low pH could be identified in IR difference spectra at pH 5,0. This intermediate is crucial for the active proton transport over the cell membrane and its existence is still disputed. Furthermore, Glu-108 has been identified as a possible substitute for the proton acceptor Asp-97 at low pH.

An intrinsic pH-sensor proved that there is a proton release in the M-intermediate at pH 5,0. In combination with the observation of two Asp or Glu involved in the photocycle, an active proton transport becomes likely. The position of the probable candidates for the involved Asp/Glu residues furthers the proposal of a bidirectional proton pumping above and below the pK_a -value of Asp-97. The conclusion from the IR measurements hint at a tripartite function of PR depending on the pH. For pH 9,0, pH 5,5 to 8,5 and pH 5,1 a different behavior for the proton transport could be observed.

The second part of this work focused on the creation of a new approach for the study of carboxylation reactions and its application on RuBisCO. The activation of this enzyme is poorly understood, despite the fact that RuBisCO is the most abundant enzyme on the planet. It catalyzes the first step in the carbon dioxide fixation and has been crystallized from various organisms.

Nevertheless, the carbamate formation with an active side lysine as first step in its catalytic circle is still not fully understood. The activation process could be directly observed, using a caged carbon dioxide in combination with rapid-scan IR spectroscopy.

The results indicate that Mg^{2+} is not a necessary part of the carbamate formation, although it is later needed for the substrate binding. In addition, it became apparent, that azide (isoelectric to CO_2) is able to block the active side, but it can slowly be replaced by CO_2 .

These findings promote our understanding of RuBisCO and prove that the combination of caged- CO_2 with IR spectroscopy presents a successful approach to the study of carboxylation reactions. In the future it can be applied to studies on the protein family of biotin binding carboxylases.

3 Einleitung

3.1 Biologische Systeme - Proteorhodopsin und RuBisCO

3.1.1 Retinalproteine

Retinal bindende Proteine, die eine α -helikale Struktur mit sieben Transmembranhelices besitzen, spielen eine herausragende Rolle als Photorezeptoren in Zellen. Vertreter dieser Gruppe können in Archaeen, Prokaryonten, einzelligen eukariotischen Mikroben oder auch den Sehzentren höherer Organismen (inklusive des Menschen) vorkommen.[1] Diese Proteine binden alle ein Retinal in einer zentralen Bindungstasche im Zentrum des Helixbündels (vgl. 3.1). Retinal ist das Aldehyd des Retinols (Vitamin A). Der Chromophor wird im Inneren der Proteine meist als Imin an eine Lysin Seitenkette (BR: Lys-216, PR: Lys-231) gebunden und steuert durch seine Isomerisierung den Photozyklus und damit die Funktion der Proteine. Die Bindung an das Lysin in Form eines Imin wird in der Literatur als Schiff'sche Base bezeichnet. In freier Form kann durch die Absorption eines Lichtquants eine Reihe von verschiedenen Isomeren entstehen, die Proteinumgebung der Bindungstasche selektiert jedoch das gewünschte Isomer.

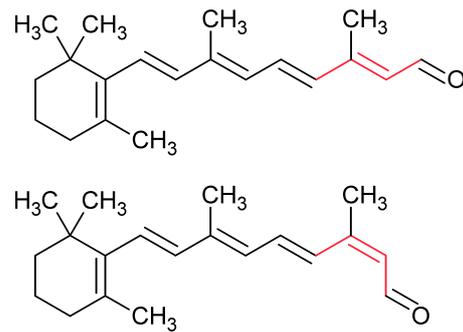


Abb. 3.1: Oben: *all-trans* Retinal Unten: *13-cis* Retinal

Vorhersagen über die Struktur der Retinalproteine an Hand ihrer Sequenz und der Hydrophilie der Aminosäureseitenketten lassen sieben Helices (Helix A bis G), die in der Membran eingebettet sind, erwarten. Diese Vorhersagen können durch Kristallstrukturanalysen bestätigt werden. Obwohl Membranproteine im allgemeinen schwer kristallisiert werden können, ist das unter anderem für Bacteriorhodopsin,

Rhodopsin, Sensor-Rhodopsin II, Xanthorhodopsin und Halorhodopsin gelungen.[2, 3, 4, 5]

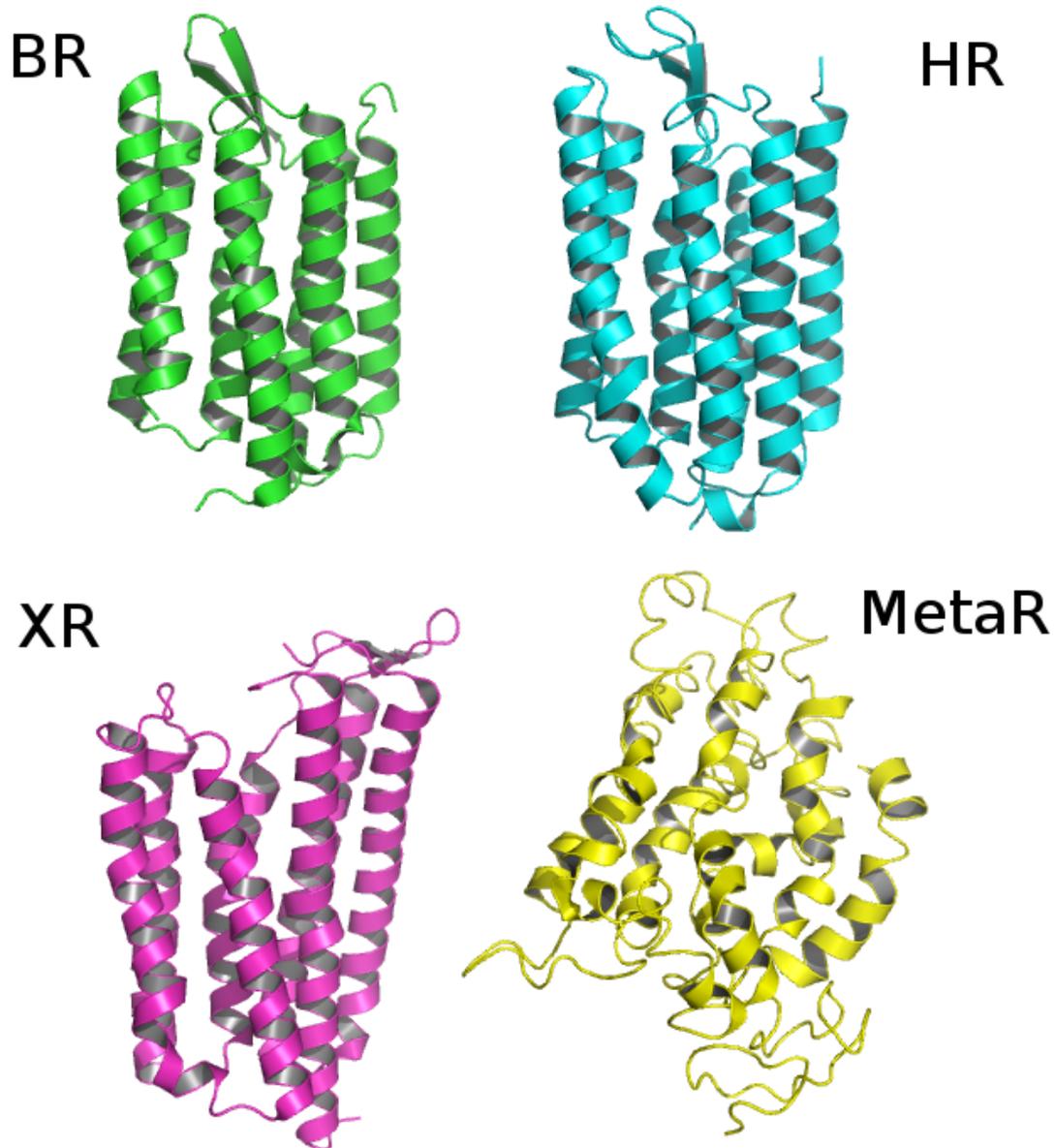


Abb. 3.2: Kristallstrukturen für vier Retinal-bindende-Proteine aus der pdb-Datenbank. Im einzelnen sind Bacteriorhodopsin (BR)[1C3W], Halorhodopsin (HR)[1E12], Xanthorhodopsin (XR) [3DDL] und Rhodopsin (Meta-Intermediat) [1LN6] gezeigt.

In Abbildung 3.2 ist eine Reihe von Retinalproteinstrukturen gezeigt. Die Strukturen stammen alle aus den Datensätzen der pdb-Datenbank und zeigen sehr anschaulich,

dass BR, HR und XR eine sehr ähnliche Struktur haben. Auch Rhodopsin sieht in seinem Grundzustand sehr ähnlich aus. Allerdings ist in der Abbildung die Kristallstruktur eines Intermediats (Meta I) des Photozyklus gezeigt, das verdeutlichen soll, wie groß die Konformationsänderungen in den Helices sein können.

Die große Familie der Retinalproteine erfüllt verschiedene Funktionen, zu denen der Protonentransport über die Zellmembran, die Funktion als Sensor oder als Kanal gehören. Diese unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Retinalproteine führen zu einer Klassifizierung in zwei große Familien. Typ I besteht aus archaealen Rhodopsinen die als erstes im archaealen Organismus *Halobacterium salinarium* entdeckt wurden. Alle Typ I Retinalproteine transportieren verschiedene Substrate über die Membran und durchlaufen einen Photozyklus. Die absorbierte Energie nutzen sie z.B. zum Protonentransport über die Membran (Bacteriorhodopsin (BR), Xanthorhodopsin (XR) und Proteorhodopsin (PR)), zum Transport von Chlorid (Halorhodopsin (HR)) oder sind Rezeptoren für die Phototaxis von Einzellern (Sensor Rhodopsin I und II (SRI bzw. SRII)).

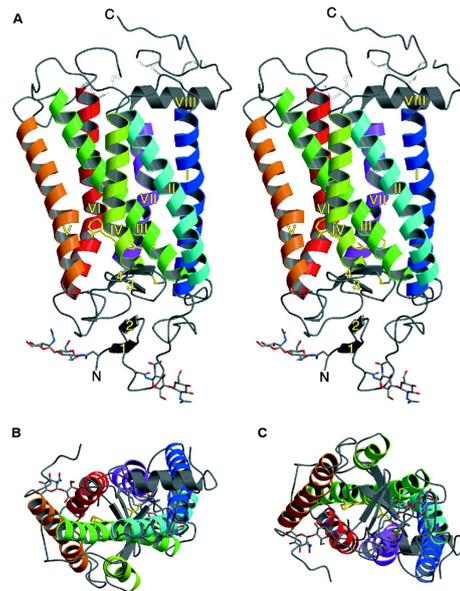


Abb. 3.3: Die dunkeladaptierte Kristallstruktur Rhodopsins aus [6]

Zu den Typ II Retinalproteinen gehören vor allem die photosensitiven Proteine in den Augen von Tieren oder auch in menschlichen Augen. Die Stäbchen im Auge beinhalten mehr als 1000 Membranschichten, deren Proteingehalt zu 90% aus Rhodopsin besteht. Als Rhodopsin bezeichnet man dabei die Einheit aus Retinal und Protein (Opsin). Das Rhodopsin ist an ein G-Protein gekoppelt und gibt durch die photoinduzierte Konformationsänderung des Helixbündels das Signal an das G-Protein Transducin weiter. Von den sieben Helices sind vor allem Helix C und F an der Signalleitung beteiligt.[7, 8] Ein Schlüsselement für die Funktion von Rhodopsin ist das Wechselspiel zwischen der protonierten Schiff'schen Base (der Verbindung zwischen Chromophor und dem Protein) und dem Gegenion, das meist ein Glutamat oder Aspartat ist. Vor allem infrarotspektroskopische Studien konnten hierzu wertvolle Hinweise

geben und belegen, dass zwei Glutamate (Glu-113 und Glu-181) hierbei entscheidend sind.[9]

Während Rhodopsin ein lichtinduziertes Signal weiterleitet, haben die Typ I Retinalproteine eine direktere Funktion und transportieren verschiedene Substrate über die Membran. Auch hier spielt die protonierte Schiff'sche Base und das dazu gehörige Gegenion eine große Rolle. Den ersten Schritt des Photozyklus bildet dabei immer die Isomerisation des Chromophors entlang einer Doppelbindung. Typ I Retinalproteinen zeigen dabei immer eine *all-trans* zu *13-cis* Konformationsänderung, während der dunkeladaptierte Zustand der Typ II Proteine ein *11-cis* Retinal ist, das zu einer *all-trans* Struktur übergeht.

Tab. 3.1: Wichtige Retinalproteine mit Angabe des Isomers des Chromophors vor der Anregung und dem Anregungsmaximum.

Protein	Retinal Isomer	Absorption pH 7.0 [nm]	Typ
Rhodopsin	<i>11-cis</i>	495	II
Bacteriorhodopsin	<i>all-trans</i>	568	I
Halorhodopsin	<i>all-trans</i>	578	I
Sensor-Rhodopsin I	<i>all-trans</i>	587	I
Proteorhodopsin	<i>all-trans</i>	520	I

Der Photozyklus des Bacteriorhodopsins soll exemplarisch genauer beschrieben werden, da es die größte funktionelle Ähnlichkeit zum später untersuchten Proteorhodopsin aufweist und bereits gut charakterisiert ist. Das Protein nutzt die Energie aus der Photoisomerisierung seines Chromophors (*all-trans* zu *13-cis* Retinal), um Protonen vom Cytoplasma in die extrazelluläre Matrix zu pumpen. Die Details des Photozyklus werden bereits seit mehr als dreißig Jahren untersucht.[10] Aus der historischen Entwicklung stammt auch die Benennung der Intermediate in einem 1-Buchstaben-Code. Da die Intermediate mit einer (De)Protonierung des Retinals oder Änderungen im Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk der Bindungstasche einher gehen, sind sie leicht über die Veränderungen im Absorptionsspektrum des Chromophors zu beobachten. Meist wird das Absorptionsmaximum eines Intermediats seiner Buchstabenkennung hinzugefügt.[11, 12]

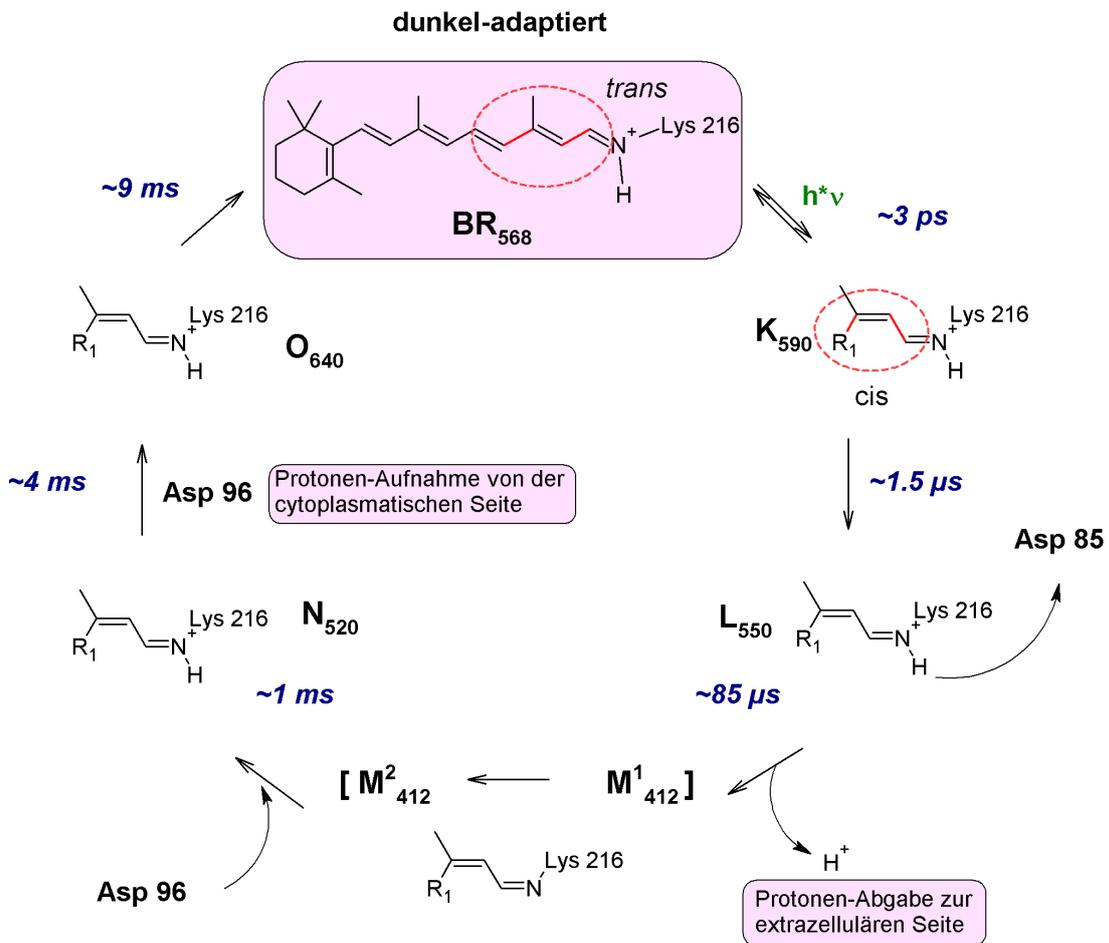


Abb. 3.4: Photozyklus von BR mit einem Blick auf den Protonierungsgrad des Retinals und Schlüsselaminosäuren. Für alle Intermediate ist das Absorptionsmaximum des Chromophors als Index angegeben. Die Zeiten für die Übergänge sind angegeben, bilden allerdings nur Richtwerte, da Wassergehalt, Lipidart und Probenpräparation darauf einen großen Einfluss haben. Wichtig ist vor allem der Übergang von *all-trans* zu 13-*cis* aus der dunkeladaptierten Form und die (De)Protonierungen im M- und N-Intermediat.

In Abbildung 3.4 ist ein Überblick über die verschiedenen Intermediate des BR Photozyklus zu sehen. Es sind ausschließlich die wichtigen Bindungen des Chromophors und einige Aminosäuren gezeigt. Bei den beiden Aminosäuren Asp-85 und Asp-96 handelt es sich um den Protonenakzeptor und -donor im BR Photozyklus. Im ersten Schritt des Photozyklus absorbiert das Retinal Licht und eine erste konformelle Änderung von *all-trans* nach 13-*cis* Retinal findet statt. Obwohl dieser Prozeß sehr schnell abläuft (fs bis ps), gibt es Hinweise aus der Kurzzeitspektroskopie (IR und Vis) auf eine Beteiligung der Proteinumgebung an diesem ersten Schritt.[13] Mit Erreichen des K-Intermediats ist die *all-trans* zu 13-*cis*-Isomerisierung abgeschlossen. Im

L-Intermediat findet eine Wechselwirkung der Schiff'schen Base mit dem Protonenakzeptor Asp-85 statt, dieses Intermediat ist fast ausschließlich in Infrarotspektren (IR-Spektren) identifizierbar. Um überhaupt ein Proton durch die Membran zu schleusen, bedarf es einer Konformationsänderung des Proteins, also einer Öffnung gegenüber der extrazellulären Matrix. Im M Intermediat kann man diese Öffnung zur extrazellulären Seite in IR-Spektren anhand von Differenzbanden des Proteinrückrats gut erkennen. Die Bewegungen des Helixbündels können simultan mit der Deprotonierung der Schiff'schen Base beobachtet werden. In den Vis-Spektren des M-Intermediats wird zudem die Deprotonierung der Schiff'schen Base deutlich. Allerdings ist der Weg des Protons von der Bindungstasche zur extrazellulären Matrix nur schwer spektroskopisch zu fassen. Es gibt aber Hinweise, dass Wassercluster im Inneren des Proteins am Transport beteiligt sind.[14] In den späten Intermediaten des Photozyklus wird die Schiff'sche Base wieder protoniert (durch Asp-96) und der Chromophor isomerisiert wieder in den *all-trans* Ausgangszustand. Der Protonentransport über die Membran ist abgeschlossen, wenn zwischen dem N- und O-Intermediat ein Proton von der cytoplasmatischen Seite aufgenommen wird.

3.1.2 Proteorhodopsin - Grundlagen und biologische Relevanz

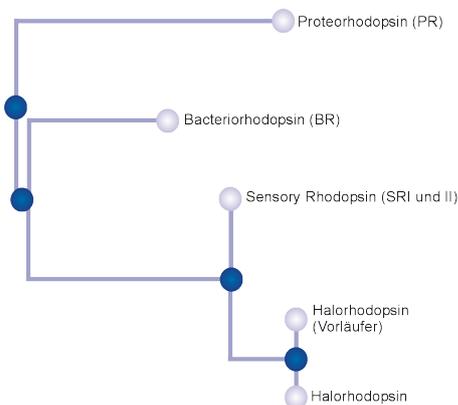


Abb. 3.5: Phylogenetischer Baum für Proteorhodopsin. Der Baum wurde mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool ¹) erstellt und stark vereinfacht.

Proteorhodopsin (PR) ist ein relativ neuer Vertreter der Familie der Retinalproteine und eng verwandt mit den im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten anderen Retinalproteinen. In der letzten Dekade ist PR in marinen Proteobakterien in verschiedenen Ökosystemen der Weltmeere entdeckt worden.[15, 16, 17, 18, 19, 20] Es ist ein α -helikales Membranprotein mit sieben Helices aus 249 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 27 kD, das Protonen über eine Membran pumpen kann. Der Chromophor ist wie bei allen Retinalproteinen ein Retinal, das kovalent über eine Schiff'sche Base an Lys-231 gebunden ist. Abhängig vom Absorptionsmaximum des Chromophors werden PR in grün absorbierende (GPR) und blau absorbierende (BPR) PR unterschieden.[15, 21] BPR kann durch eine einzige Mutation in GPR umgewandelt

werden. PR in grün absorbierende (GPR) und blau absorbierende (BPR) PR unterschieden.[15, 21] BPR kann durch eine einzige Mutation in GPR umgewandelt

werden, dennoch unterscheiden sich beide Varianten in ihrer Aktivität. BPR zeigt einen langsameren Photozyklus und hat daher wahrscheinlich eher eine regulatorische Funktion, während GPR mit deutlich größerer Effizienz Protonen über die Membran pumpt.[17] Genetische Studien an verschiedenen Meeresorganismen in verschiedenen maritimen Regionen zeigen, dass PR ein sehr weit verbreitetes Protein ist und daher mit großer Sicherheit eine wichtige Rolle für die Energiebalance der Biosphäre spielt.

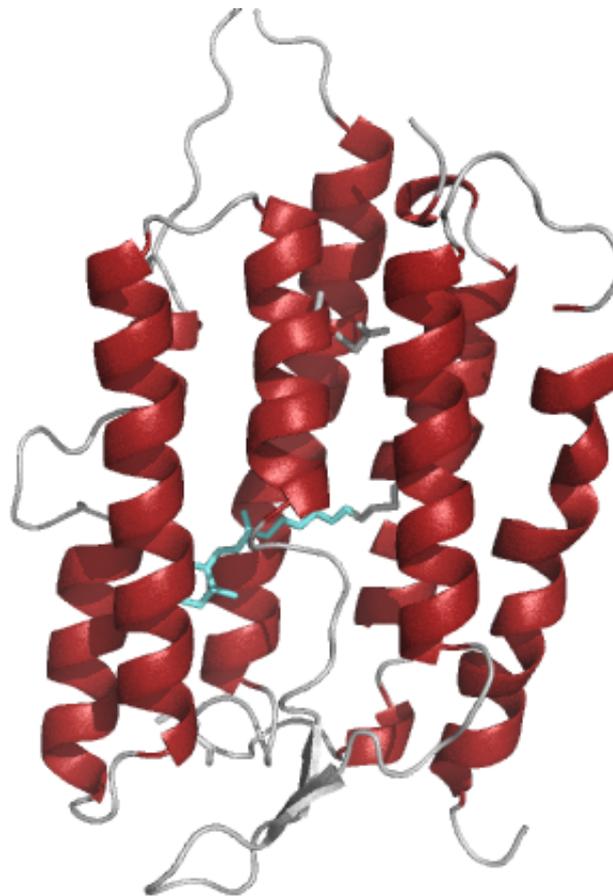


Abb. 3.6: Vereinfachte Homologiestruktur von Proteorhodopsin. Die Sequenz wurde an die BR Kristallstruktur 1C3W aus der pdb-Datenbank angepasst.(vgl. ähnliche Darstellung in [22]) Im Zentrum des Helixbündels sitzt der kovalent gebundene Chromophor (türkis) kovalent an Lys-231 gebunden.

Die genaue Struktur des Proteins ist bisher nicht bekannt, da es nicht gelungen ist, eine Kristallstruktur zu erhalten. Allerdings wurden eine Reihe von Studien mit der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Elektronenmikroskopie (EM) durchgeführt, um die Topologie des Proteins zu beobachten.[23, 24] Diese Messungen zeigen, dass Pro-

teorhodospin 2D Kristalle in den einzelnen Schichten Hexamere oder Pentamere bilden, allerdings ist nicht geklärt, ob diese Quartärstruktur einen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat. Jedoch ist für das homologe BR bekannt, dass es in Purpurmembranen im natürlichen Zustand als 2D Kristall vorliegt. In der Purpurmembran bildet ein BR-Trimer eine hexagonale Einheitszelle, in der sich auch Lipidmoleküle befinden.[25] Zusätzlich gibt es eine Reihe von Ansätzen, die PR Sequenz in vorhandene Kristallstrukturen homologer Proteine wie BR oder SR einzupassen.[15, 16, 26] Diese Homologiemodelle sind hilfreiche Visualisierungen der Proteinstruktur und erleichtern die Interpretation spektroskopischer Daten.

Vor allem die vermutlich am Protonentransport beteiligten Aminosäuren sind im PR gut konserviert und entsprechen im wesentlichen den analogen Aminosäuren im BR. Erwähnenswert sind vor allem der Protonenakzeptor Asp-97 (evtl. Asp-227 und Arg-94) und der Protonendonator Glu-108. Die Homologen im BR sind Asp-85 (Protonenakzeptor), Lys-216 (Schiff'sche Base) und der Protonendonator Asp-96. Im Vergleich zu anderen Retinalproteinen, namentlich z.B. BR oder SR I, ist der pK_a -Wert des Protonenakzeptors Asp-97 ungewöhnlich hoch und liegt zwischen pH 7,2 und pH 8,0.[27, 22, 28, 29] Eine Titration des Homologs Asp-85 in BR zeigt einen pK_a -Wert von ≈ 2.6 . [30] Eine Erklärung für diesen pK_a -Wert ist ein Aspartat-Histidin-Komplex, der ebenso in der eukariotischen Protonenpumpe XR gefunden wurde.[31] Allerdings ist eine Komplexierung durch das Histidin allein eine zu schwache Erklärung für die ungewöhnlichen pH-Eigenschaften des Protonenakzeptors. Die natürliche Umgebung des Proteins weist allerdings einen pH-Wert zwischen 7.5 und 8.1 auf.[32] Damit befindet sich das Protein in einer Umgebung, bei der der Protonenakzeptor nur zum Teil deprotoniert vorliegt und somit die Effizienz der Pumpe eingeschränkt ist. Allerdings ist es möglich, dass lokal an der Zellmembran andere pH-Werte herrschen. Mit diesen Informationen stellt sich allerdings auch die Frage, ob PR nicht nur eine schlichte lichtgetriebene Pumpe, sondern evtl. auch ein sensorisches Protein ist.

Der Photozyklus wurde analog zum Photozyklus des BR benannt und man spricht von K, (L), M, N und O Intermediaten. Beim PR ist es jedoch unumgänglich, den Photozyklus bei pH-Werten ober- und unterhalb des pK_a -Werts des Protonenakzeptors zu betrachten. Der in Abbildung 3.7 gezeigte Photozyklus entspricht den Erkenntnissen von Friedrich et. al. ([33]) und anderen Gruppen, die bei Raumtemperatur mit zeitaufgelösten IR-, Raman oder Vis-Methoden die Intermediate untersucht haben. Im Alkalischen bei pH 10 zeigt der Photozyklus K-, M-, N- und O-Intermediate, die sich allerdings beständig im Gleichgewicht miteinander befinden. Es ist nicht mög-

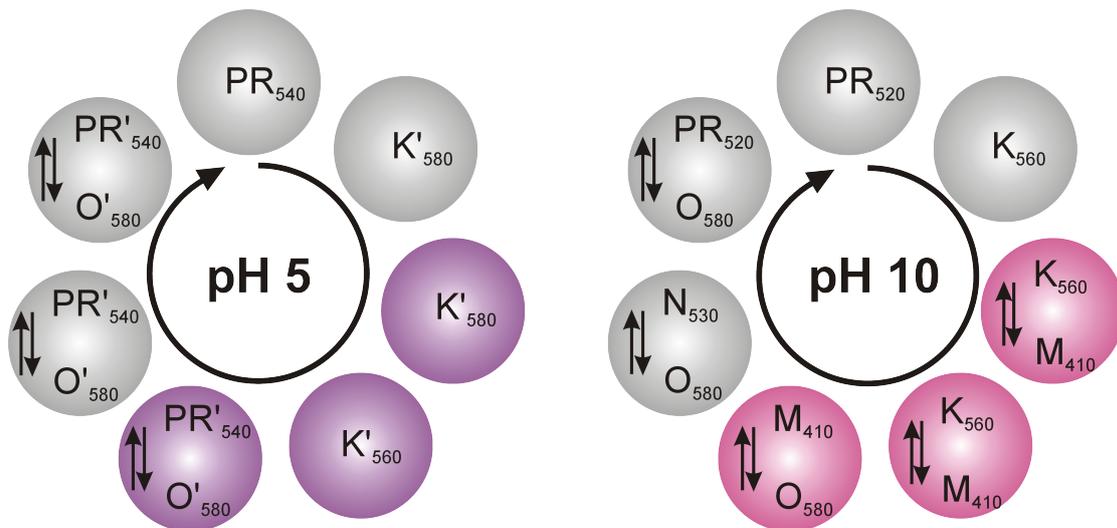


Abb. 3.7: Der Photozyklus von PR nach [33] ist unter alkalischen Bedingungen nahezu identisch mit dem BR Photozyklus, bei sauren pH Werten ändert sich das Bild allerdings und das M Intermediat ist nicht beobachtbar. Die Zuordnung der Intermediate erfolgt allerdings an Hand IR-spektroskopischer Daten bei Raumtemperatur.

lich, klar definierte Intermediate wie beim BR zu beobachten. Bei einer Absenkung des pH-Werts auf 5 zeigt sich allerdings ein gänzlich anderes Bild. Das M-Intermediat ist nicht länger beobachtbar und damit fehlt der entscheidende Schritt für die Öffnung des Proteins zur extrazellulären Matrix.

Aus Sicht der Spektroskopie sollte somit kein gerichteter Transport mehr stattfinden. Diese Aussage wird jedoch kontrovers diskutiert. Es gibt Studien, die eine Inversion der Pumprichtung für den Übergang von alkalischem zu saurem pH vorhersagen.[?] Allerdings existieren auch Photostrommessungen, die nicht bestätigen konnten, dass es eine Inversion der Pumprichtung gibt.[34, 28, 35, 36] Damit wirft der Photozyklus bei pH-Werten, die kleiner sind als der pK_a -Wert von Asp-97, noch immer eine Vielzahl von Fragen auf. Ohne weiterführende Untersuchungen zur Existenz eines aktiven Protonentransport, seine Richtung und die Charakterisierung der daran beteiligten Aminosäuren, kann die Funktion von PR nicht vollständig verstanden werden. Damit bietet sich gerade für die IR-Spektroskopie eine Vielzahl von Ansatzpunkten, um zur Aufklärung dieser Problematik beizutragen.

3.1.3 RuBisCO

Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) ist das Schlüsselenzym der biologischen Kohlenstoffdioxid (CO_2) Fixierung und damit von herausra-

gender Bedeutung für das Leben. Im Rahmen des Kohlenstoffkreislauf stellt RuBisCO als Teil des pflanzlichen Lebens den Eintrittspunkt von gasförmigem CO₂ in die Biosphäre da. RuBisCO ist damit nicht ohne Grund das am meisten verbreitete Protein der Welt. Der bei Elementaranalysen bestimmte Stickstoffgehalt in Blättern wird zu mehr als 50% RuBisCO zugeordnet, das mit 560 kDa und jeweils acht kleinen und acht großen Untereinheiten zu den größten bekannten Enzymen gehört.[37][38][39] Jeder einzelne RuBisCO-Komplex verfügt damit über acht aktive Zentren, in denen die Kohlenstoffdioxidfixierung stattfinden kann.

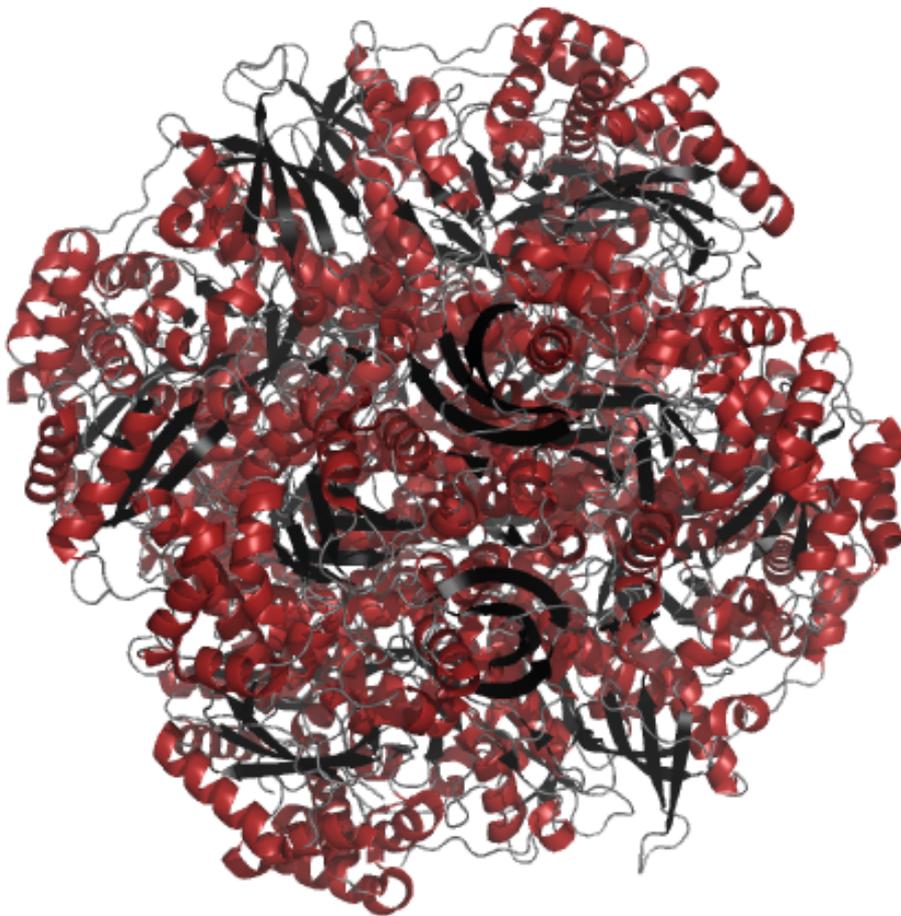


Abb. 3.8: RuBisCO aus Spinat, Röntgenkristallstruktur 1UPM aus der PDB-Datenbank. Das Enzym wurde mit 2-Carboxyarabinitol-2-Bisphosphat und Ca²⁺ kristallisiert.

RuBisCO katalysiert die Addition von CO₂ und H₂O an D-Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP). Dabei wird CO₂ an die Doppelbindung der Enolform der Ribulose addiert und das Reaktionsprodukt zerfällt in mehreren Schritten in 3-Phospho-D-Glycerat.

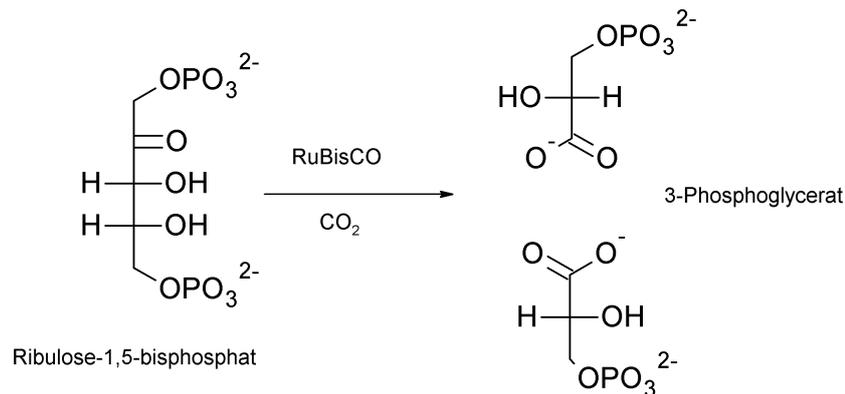


Abb. 3.9: Edukt und Produkt der von RuBisCO katalysierten Reaktion.

Neben dieser ureigenen Funktion von RuBisCO gibt es allerdings eine unerwünschte Nebenreaktion mit Sauerstoff, bei der das Substrat RuBP oxidiert wird. Dabei wird ebenfalls das Enolat angegriffen, allerdings reagieren Sauerstoff und Wasser mit dem Substrat zu einem Peroxyketon, das anschließend zu je einem Molekül 3-Phospho-D-Glycerat und 2-Phosphoglycolat zerfällt. Welcher Reaktionsweg eingeschlagen wird, hängt von mehreren Faktoren ab. Das Enzym selbst (abhängig von der Spezies), lichtabhängige Aktivasen oder die CO_2 - und O_2 -Konzentration beeinflussen die Aktivität. Außerdem dient das Substrat RuBP gleichzeitig in höheren Konzentrationen als Inhibitor.

Die Struktur der Bindungstasche und verschiedene Intermediate mit gebundenem Substrat sind mit Hilfe von kristallographischen Untersuchungen charakterisiert worden. Allerdings geben diese Strukturen immer nur einen punktuellen Einblick in die Funktionsweise des Enzyms und können wenig über Kinetik und Gleichgewichtslage im Reaktionszyklus aussagen. Die in der PDB-Datenbank hinterlegten Strukturen aus Landpflanzen und grünen Algen lassen sich in Form I- und Form II-RuBisCO Holoenzyme aufteilen. Die beiden Formen unterscheiden sich in der Anzahl der Untereinheiten. Während Form I Holoenzyme acht kleine und acht große Untereinheiten aufweisen, bestehen Form II-Enzyme aus einem Homodimer zweier großer Untereinheiten. Das in dieser Arbeit später genauer untersuchte RuBisCO aus Spinat gehört zu den Form I Holoenzymen.

3.1.3.1 Detaillierter Reaktionszyklus und Aktivierungsprozesse

Die Details des RuBisCO Reaktionszyklus sind bisher vornehmlich über chemische Modifikationen, Mutagenese des Enzyms und strukturelle Untersuchungen gewon-

nen worden.[40][41] Im folgenden Abschnitt werden die am Reaktionszyklus beteiligten Aminosäuren nach der Numerierung aus Spinat-RuBisCO benannt. Der vorgestellte Mechanismus involviert die Aktivierung des Enzyms über die Carbamatbildung eines CO₂ Moleküls mit Lys-201 und die Stabilisierung dieses Carbamats über positive zweiwertige Kationen (Mg²⁺). Erst nach der Carbamatbildung befindet sich das Enzym in seiner aktiven Form und kann das Substrat RuBP binden und in die 2,3-Endiolat Form konvertieren. An die Doppelbindung dieses Endiolats kann dann ein weiteres CO₂-Molekül angreifen.

Die Aktivierung von RuBisCO passiert spontan bei leicht alkalischen Bedingungen. Das aktive Zentrum wird zu Teilen von einer Faserstruktur des C-Terminus und von einer weiteren Untereinheit des Dimers gebildet. Im inaktiven Zustand ist das Zentrum gut zugänglich für Cofaktoren und das Substrat, allerdings ändert sich das nach der Bindung von RuBP durch die Bewegung einiger Schleifen über die Öffnung. Drei weitere Aminosäuren (Glu-60, Thr-65 und Asn-123) der L-Untereinheit werden dadurch Teil der Bindungstasche und sind wahrscheinlich am Mechanismus beteiligt.[42] Als erster Schritt der Aktivierung reagiert allerdings das freie CO₂ mit der neutralen Aminogruppe von Lys-201. Dabei ändert sich laut kristallographischen Untersuchungen des aktivierten Enzyms die Proteinumgebung nur unwesentlich und größere Bewegungen oder Änderungen der Sekundärstruktur sind nicht zu beobachten.[43][44] Das in unmittelbarer Umgebung koordinierte Mg⁺ wird zusätzlich vor allem durch Asp-203 und Glu-204 als einzähnige Liganden koordiniert. Zusätzlich zu den Proteinseitenketten und dem Carbamat wird die Koordinationssphäre des Magnesiumions durch drei Wassermoleküle vervollständigt.

Im nächsten Schritt wird in der Bindungstasche das Substrat RuBP koordiniert und damit die Koordinationssphäre des Mg⁺ vervollständigt. Da das C₂ und C₃ Kohlenstoffatom über den Carbonyl- bzw. Hydroxylsauerstoff an das Magnesiumion gebunden wird und das C₃-Proton in direkter Nähe zum Carbamatsauerstoff ist, wird die Bildung eines Endiols favorisiert. Das C₃-Proton wird abstrahiert (vgl. 3.10). Das entstehende cis-Endiol ist außerhalb der Bindungstasche nicht stabil und kann nur durch die Koordination mit der Umgebung für einen ausreichend langen Zeitraum stabilisiert werden. Ausgehend vom cis-Endiol gibt es zwei zentrale Reaktionswege für RuBisCO. Der in der biologischen Energiegewinnung erwünschte Weg läuft über die Fixierung des CO₂-Moleküls in Form eines 3-Phospho-D-Glycerats. Zusätzlich reagiert RuBisCO mit Sauerstoff und leitet damit die Spaltung des RuBP in zwei Moleküle 2-Phospho-Glykolat ein. Dieser zweite Reaktionsweg führt allerdings zu einem Ener-

gieverlust, da das Substrat verbraucht wird, ohne geeignete Metaboliten für die Zelle herzustellen. Zusätzlich ist wieder Energie erforderlich um das 2-Phospho-Glykolat in eine nutzbare Verbindung zu verwandeln.

Beide Reaktionswege beginnen mit der Addition von CO_2/O_2 an die $\text{C}_2=\text{C}_3$ Bindung des cis-Endiols. Dabei sorgt die Geometrie der Bindungstasche und der „Deckel“ aus

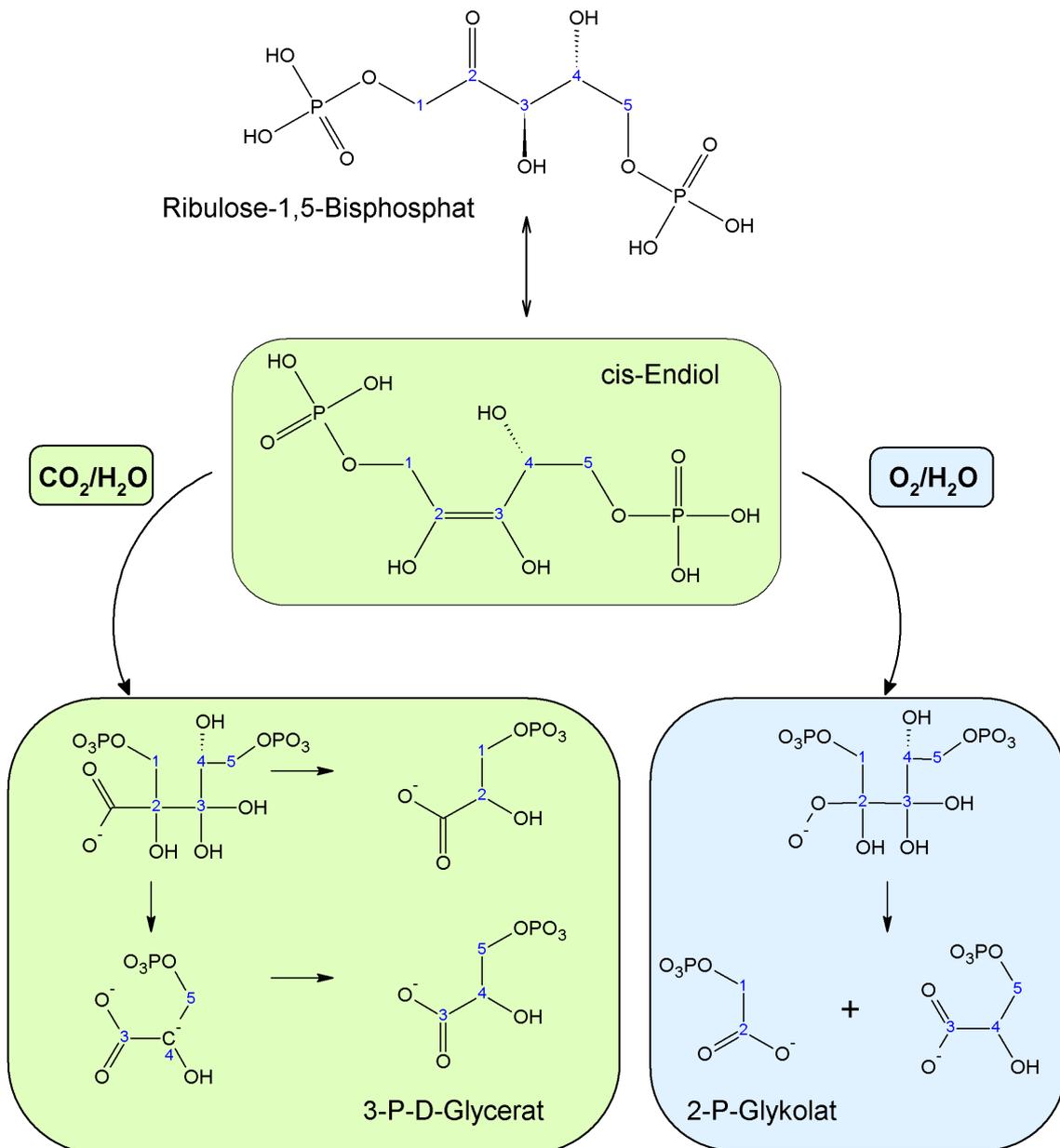


Abb. 3.10: Die Abbildung zeigt die im aktiven Zentrum stattfindende Reaktion von Ribulose-1,5-Bisphosphat mit CO_2 oder O_2 . Die Beteiligung des Enzyms wird dabei vollständig ausgeblendet und nur die chemischen Reaktionen des Substrats bleiben sichtbar.

den Schleifen der L-Untereinheit für einen Tunnel zum C₂-Kohlenstoff des Substrats, der nur für kleine Moleküle wie CO₂ und O₂ passierbar ist. Die Addition erfordert zusätzlich ein Wassermolekül, was bereits in der Bindungstasche eingeschlossen ist. Der genaue Mechanismus der Addition ist allerdings nicht perfekt verstanden. Im letzten Teil des CO₂-Reaktionswegs wird die C₂-C₃ Bindung gebrochen und ein erstes Molekül 3-Phospho-Glycerat freigesetzt. Das ist das Signal für die Öffnung der Bindungstasche, damit das Produkt in die Umgebung entlassen werden kann. Als letztes muss noch die zweite C₃-Einheit stereospezifisch protoniert werden, bevor das zweite 3-Phospho-Glycerat freigesetzt werden kann.

3.2 Spektroskopische Methoden

3.2.1 Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektroskopie hat sich in der Vergangenheit vielfach als sensitive und exakte Methode zur Betrachtung biologischer Systeme erwiesen. Sie beruht auf der Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des Spektrums durch Molekülschwingungen. In der IR-Spektroskopie wird direkt die Absorption einer Probe gemessen und nicht wie in der Ramanspektroskopie die Streustrahlung. Dabei betrachtet man bei biologischen Proben meist einen Bereich von $\lambda = 2,5\mu\text{m} - 15\mu\text{m}$. Die Position von Banden im IR-Spektrum wird jedoch meist in Wellenzahlen [cm^{-1}], also der reziproken Wellenlänge angegeben.[45][46]

$$\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = \frac{10^4}{\lambda[\mu\text{m}]} \quad (3.1)$$

Das hat den Vorteil, dass Wellenzahlen direkt proportional zur Energie ΔE sind. Im einfachsten Fall beschreibt man Molekülschwingungen als eine Überlagerung der Schwingungen einzelner Bindungen und betrachtet diese nach dem Hook'schen Gesetz als zwei Kugeln, die über eine Feder mit der Kraftkonstante k verbunden sind. Diese Kraftkonstante ist ein Maß für die Bindungsstärke. Um die Energie einer Schwingung und damit die Position ihrer Bande im Spektrum zu erhalten, verwendet man das Modell des harmonischen Oszillators. Als potentielle Energie wird dabei in die Schrödingergleichung die Funktion des Kernabstands r eingesetzt. Generell gilt, dass eine stärkere Bindung und kleinere Massen der schwingenden Atome jeweils zu höheren Schwingungsfrequenzen führen.

$$E_{VIB} = h\nu_{OSC} \left(n + \frac{1}{2} \right) = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (3.2)$$

$$\Delta E_{VIB} = E_{n+1} - E_n = h\nu_{OSC} \quad (3.3)$$

n	Schwingungsquantenzahl
h	Planck'sches-Wirkungsquantum
E_{VIB}	Schwingungsenergie

Um überhaupt eine Bande im IR-Spektrum zu beobachten, muss sich das Dipolmoment während der Schwingung ändern. Das führt dazu, dass symmetrische Schwingungen in symmetrischen Molekülen im IR-Spektrum nicht sichtbar sind. Diese Schwingungen können nur in der Raman-Spektroskopie beobachtet werden, deren Auswahlregeln eine Änderung der Polarisierbarkeit der Bindung verlangen.

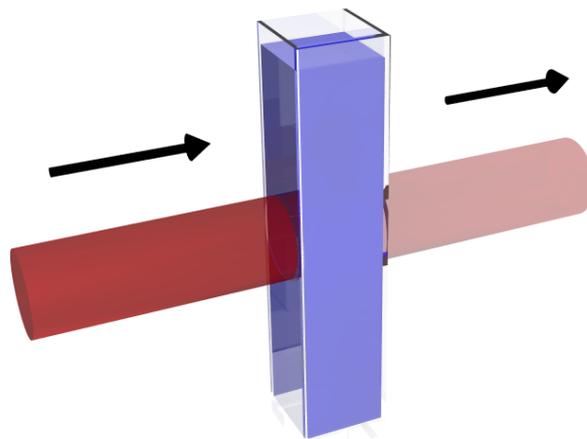


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des Lambert-Beer Gesetzes, das die Abschwächung von Strahlung beim Durchtritt durch eine Probe beschreibt ($I_0 \rightarrow I$).

Für die IR-Spektroskopie an Proteinen gibt es eine Vielzahl an Techniken und Probenformen. Häufig wird hierbei ein Absorptionsspektrum gemessen, das aus einem Hintergrund- und einem Probenspektrum berechnet wird. Die Aufnahme der Einkanalspektren des Hintergrunds [I_0] und der Probe [I] kann dabei getrennt erfolgen. Dennoch wird im allgemeinen darauf geachtet, dass Hintergrund und Probe unter

vergleichbaren Bedingungen gemessen werden, da selbst kleine Temperaturschwankungen oder Änderungen in der Luftfeuchtigkeit einen Einfluß auf die Messung haben oder für störende Banden sorgen. Aus den Einkanalspektren kann dann mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz das Absorptionsspektrum berechnet werden.[47]

$$A = c \cdot d \cdot \epsilon = -\lg \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (3.4)$$

A	Absorption
c	Konzentration
d	Schichtdicke
ϵ	Extinktionskoeffizient

Im einfachsten Fall besteht ein Infrarotspektrometer somit aus einer Lichtquelle, einem Monochromator, einem Probenhalter und einem Detektor. In diesem Fall können I und I_0 nacheinander für jede einzelne Wellenzahl bestimmt werden und das Absorptionsspektrum kann danach zusammengesetzt werden. In der modernen Infrarotspektroskopie wird jedoch meist die Fourier-Transform Infrarotspektroskopie verwendet (FTIR-Spektroskopie), um Spektren in kürzerer Zeit, mit einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis und hoher Wellenzahlpräzision aufnehmen zu können. Die Vorteile der FTIR-Spektroskopie lassen sich in drei Grundsätze zusammenfassen:

1. Multiplex-Vorteil Gleichzeitige Detektion aller Wellenlängen. (Besseres Signal-Rausch-Verhältnis)
2. Jacquinot-Vorteil Die gesamte Lichtintensität steht durch das Wegfallen von Spaltblenden zur Wellenlängenselektion zur Verfügung und damit eine größere Messlichtintensität. (Besseres Signal-Rausch-Verhältnis)
3. Connes-Vorteil Hohe Wellenzahlpräzision durch die interne Kalibrierung mit einem Laser mit sehr genau bekannter Frequenz, dessen Interferenzminima und -maxima die genaue Position des Interferometers und damit die Wellenzahlgenauigkeit angeben.

Nur in Situationen, in denen hohe Meßlichtintensität notwendig ist oder schnelle Kinetiken bei spezifischen Wellenzahlen interessant sind, verzichtet man auf die Vorteile der FTIR-Spektroskopie. Mit Hilfe von IR-Lasern oder speziellen durchstimmbaren

Dioden kann ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erzeugt werden. Diese Quellen lassen jedoch nur eine Datenaufnahme in einem eng begrenzten Wellenzahlenbereich zu.

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie benutzt den namensgebenden Algorithmus, um das Interferogramm, das die Intensität in Abhängigkeit des Weglängenunterschieds der zwei IR-Strahlen darstellt, von der Zeit- in die Frequenzdomäne zu transformieren. Bei einer monochromatischen Lichtquelle kann aus dem Interferogramm direkt die Amplitude und Frequenz der elektromagnetischen Welle bestimmt werden, sobald aber eine breitbandige IR-Quelle verwendet wird, überlagern sich die verschiedenen Beiträge.

Letztendlich entspricht das durch den Strahlteiler und den bewegten Spiegel erzeugte Interferogramm einer Fouriertransformation (FT) des Spektrums. Die mathematische Repräsentation des durch die FT verbundenen Paares aus Interferogramm ($S(\delta)$) und Spektrum ($B(\tilde{\nu})$) stellt sich wie folgt dar:

$$S(\delta) = \int_{-\infty}^{\infty} B(\tilde{\nu}) e^{i2\pi\tilde{\nu}\delta} d\tilde{\nu} \quad (3.5)$$

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\delta) e^{i2\pi\tilde{\nu}\delta} d\delta \quad (3.6)$$

δ Spiegelposition

$\tilde{\nu}$ Frequenz

Die Anwendung der FT auf dieses Interferogramm macht die Transformation rückgängig und erlaubt die Betrachtung des Spektrums. Die FT kann in vereinfachter Weise anhand eines Interferogramms erklärt werden, das die Form einer Kosinusfunktion hat. Die Funktion wird digitalisiert und punktweise mit einer zweiten Kosinusfunktion bekannter Frequenz multipliziert und aufsummiert. Nur bei übereinstimmenden Frequenzen ergibt sich eine von Null verschiedene Summe. Nur für analysierende cos-Funktionen mit einer identischen Frequenz wird das Ergebnis der Multiplikation stark positiv. Allerdings benötigt man möglichst viele Datenpunkte, damit Frequenzen, die nah an der wirklichen Frequenz liegen und einen geringen Gangunterschied haben, von der richtigen Frequenz unterschieden werden können. In der praktischen Anwendung wird die schnelle FT (FFT) verwendet, die die Rechenzeit zur

Auswertung des Interferograms signifikant verkürzt und zumeist auf dem Cooley-Tukey-Algorithmus basiert.[48] Die Auflösung eines FTIR-Spektrometers abhängig von der Weglänge Δ_{max} des bewegten Spiegels. In guter Näherung ergibt sich für die Frequenzauflösung $\Delta\tilde{\nu}$ bei gegebener maximaler Auslenkung des Spiegels:

$$\Delta\tilde{\nu} \approx \frac{1}{\Delta_{max}} \quad (3.7)$$

Einfach formuliert gilt der Zusammenhang, je länger der Weg, um so besser wird die Auflösung. Generell beeinflusst die Begrenzung der Spiegelbewegung und die Anzahl der Datenpunkte die Linienform und Auflösung des Spektrometers. Die Begrenzung entspricht einer der Multiplikation des Interferograms in den Grenzen $+\infty$ bis $-\infty$ mit einer Boxcarfunktion. Diese Funktion wird oft auch als instrumentelle Linienform (ILF) bezeichnet. Um die Seitenmaxima des Interferograms zu minimieren wird daher eine Apodisation mit einer geeigneten Funktion durchgeführt (Blackmann-Harris-, Rechteck-, Triangular- oder Trapezfunktion). Im Maximum des Interferograms ist die Apodisationsfunktion auf 1 und bei $\delta=\max$ auf null gesetzt.[47]

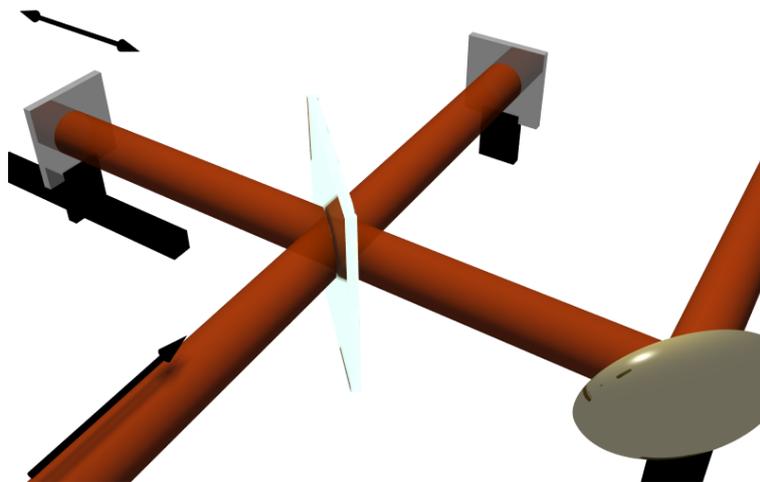


Abb. 3.12: Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers: Da vom Global emittierte Licht wird durch einen Strahlteiler auf zwei Spiegel gelenkt. Einer der Spiegel ist beweglich und erzeugt durch die Vor- und Rückwärtsbewegung das Interferogramm. Die maximale Auslenkung des beweglichen Spiegels gibt die Frequenzauflösung vor.

Das Interferogramm wird zur Glättung des späteren Spektrums häufig noch durch sogenanntes „Zero-filling“ an den Stellen außerhalb der tatsächlich erreichten Spiegelpositionen mit Nullen aufgefüllt. Allerdings kann sich dadurch die Auflösung des Spektrometers nicht verbessern. Zum Schluss muss man noch die Phaseninformation des Interferogramms in Betracht ziehen, da z.B. elektronische Filter, die hochfrequentes Rauschen herausfiltern, eine wellenzahlenabhängige Phasenverzögerung induzieren. Auch wenn der erste Datenpunkt nicht exakt bei $\delta = 0$ gemessen wird, muss eine Phasenkorrektur durchgeführt werden. Der Phasenwinkel $\Theta_{\tilde{\nu}}$ variiert nur geringfügig mit der Wellenzahl und man benutzt daher einen symmetrischen Bereich um $\delta = 0$ zur Phasenkorrektur. Das Phasenspektrum ergibt sich aus der cos-FT („reales Spektrum“) und sin-FT („imaginäres Spektrum“) des Spektrums.

$$\Theta_{\tilde{\nu}} = \arctan \frac{\text{Im}(\tilde{\nu})}{\text{Re}(\tilde{\nu})} \quad (3.8)$$

Die Details der Phasenkorrektur wurden von Mertz [49] ausgearbeitet und werden bis heute verwendet.

3.2.2 IR-Spektrometer

3.2.2.1 Lichtquellen und Detektion

In der vorliegenden Arbeit werden FTIR-Spektrometer verwendet, mit denen durch die bereits beschriebenen Vorteile in Kapitel 3.2.1 qualitativ hochwertige Proteinspektren gemessen werden können. Das Bauprinzip moderner FTIR Geräte ist dabei sehr einfach. Man benötigt eine Lichtquelle, einen sogenannten Globar („glowing bar“) aus Siliziumcarbid, der durch Erhitzen auf ca. 1500 K breitbandig Infrarotstrahlung abstrahlt. Danach wird die IR-Strahlung durch ein Michelson-Interferometer zur Probe gelenkt. Die abgeschwächte IR-Strahlung wird dann von einem DTGS (deuteriertes Triglycinsulfat)- oder MCT (Quecksilber(*mercury*)-Cadmium-Tellurid)-Detektor gemessen.

Die beiden Detektoren unterscheiden sich sowohl in ihrem Funktionsmechanismus, als auch in ihren Anwendungsbereichen. Der DTGS-Detektor ist ein pyroelektrischer Detektor und reagiert somit auf Temperaturänderungen mit einer Ladungstrennung und damit einer messbaren Spannung. Dabei reicht der Detektor bis auf einen Faktor von 10 an die Genauigkeit eines idealen thermischen Sensors heran.[50] Er ist bei Raumtemperatur einsetzbar und die Strahlungsempfindlichkeit ist unabhängig

von der Wellenlänge; einzig die thermische Trägheit und die im Vergleich zum MCT-Detektor geringere Empfindlichkeit sind als Nachteile zu nennen.

Der MCT-Detektor ist ein Photonendetektor, in dem durch das Auftreffen von Photonen Ladungsträger in das Leitungsband gehoben werden (Photoleitender Dektetektor). In anderen Ausführungen werden Photodioden aus Halbleitern mit einer Bandlücke im mittleren IR verwendet (Photodioden-Detektor).[51] Um den Bereich des mittleren Infrarots zu beobachten, muss der Detektor allerdings auf 77 K mit Hilfe von flüssigem Stickstoff gekühlt werden. Im Vergleich zum DTGS-Detektor hat er allerdings eine wesentlich geringere Anstiegs- und Abklingzeit im Bereich von Nanosekunden und ist deutlich empfindlicher.

3.2.2.2 Probenhalter und Probenform

Die gängigste Probenvorbereitung für Feststoffe ist die Mischung der Probensubstanz mit einer Trägermatrix, die im Bereich des mittleren Infrarotlichts nicht absorbiert. Im allgemeinen wird dazu Kaliumbromid verwendet, dass mit der Probe vermischt und anschließend zu Pellets gepresst wird. Allerdings können auf diese Art keine flüssigen oder sehr empfindlichen Proben gemessen werden. Eine Alternative dazu ist die ATR(attenuated total reflection)-IR-Spektroskopie. Hierbei wird das Probenmaterial auf einen hochbrechenden Kristall aufgebracht, durch den das Licht geleitet wird und der Goos-Hänchen-Effekt wird ausgenutzt, um mit einer Weglänge im Bereich weniger μm die Substanz auf der Kristalloberfläche zu untersuchen.[52] Die Eindringtiefe der evaneszenten Welle hängt dabei entscheidend vom Winkel und dem Brechungsindex der beiden Medien ab. Die ATR Technik erlaubt auch die Untersuchung von lösungsmittelhaltigen Proben, da die Weglänge kurz genug ist, um auch im Bereich der Lösungsmittelabsorption noch genügend große Transmission durch die Probe zu erreichen.[53] [54]

Gerade wässrige Proben können im mittleren Infrarot nur gemessen werden, wenn die Schichtdicke ausreichend klein ist ($<100 \mu\text{m}$). Für Transmissionsspektren müssen daher Fenster mit einer Abstandsfolie von wenigen μm Dicke oder Fenster mit einem aus einer vertieften Fläche und einem umlaufenden Graben gebildeten Probenkammer verwendet werden. In Abbildung 3.13 sind die zwei in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden gezeigt. Die Küvette für die Transmission besteht aus einem verschraubbaren Metallgehäuse, in das die Calciumfluoridfenster eingesetzt werden. Üblicherweise ist ein Fenster in der Mitter vertieft und diese Fläche ist wiederum von

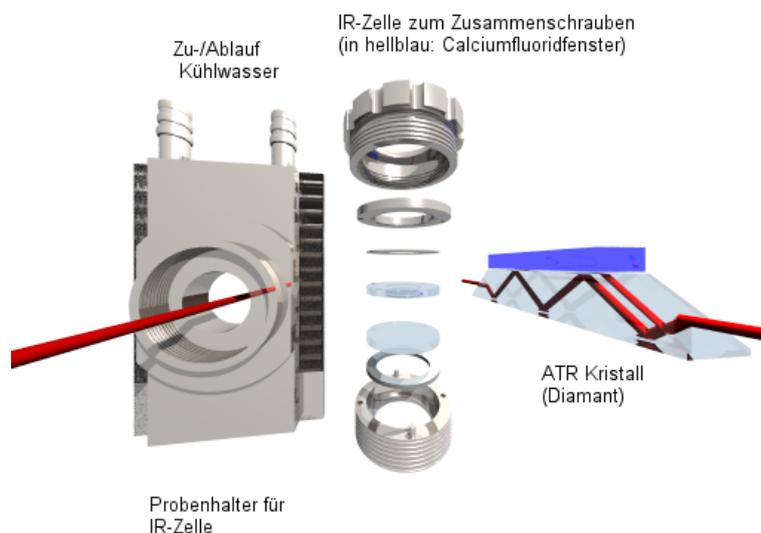


Abb. 3.13: Auf der linken Seite ist der temperierbare Probenhalter für die IR-Zelle mit dem Lichtweg zu sehen. In der Mitte erkennt man die Einzelteile der IR-Zelle mit dem äußeren Metallgehäuse, dem Spacer, einem CaF_2 -Fenster mit Graben und einem Deckfenster. Rechts ist ein ATR-Kristall mit angedeuteter Probe zu erkennen.

einem Graben umgeben, um ein Auslaufen der Zelle zu verhindern. Zusammen mit einem zweiten Fenster können so kleine Volumina ($\sim 1 \mu\text{l}$) eingeschlossen werden. Die Zelle wird anschließend mit Öl oder Teflonpaste versiegelt. Durch den temperierbaren Probenhalter können Proben im Temperaturbereich -20 bis $95 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen werden. Um die Schichtdicke zu variieren, wird statt des vertieften Fensters ein planes Fenster und eine Abstandsfolie verwendet (12 bis $100 \mu\text{m}$).

3.2.3 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie

Mit heutigen FTIR-Geräten liegt die Aufnahmezeit für ein einzelnes Absorptionsspektrum abhängig von der Auflösung und der Spiegelgeschwindigkeit des beweglichen Spiegels im Interferometer im besten Fall im Bereich einiger Millisekunden. Die Zeitauflösung wird durch die Masse des Spiegels begrenzt, der mit Frequenzen von bis zu $\sim 50 \text{ Hz}$ bewegt wird.[55] Die einfachste Form einer zeitaufgelösten FTIR-Messung ist somit die sogenannte Rapid-Scan Technik, bei der mit der maximalen

Spiegelgeschwindigkeit direkt hintereinander Spektren gemessen werden. Dadurch erreicht man eine Zeitauflösung von bis zu ca. 10 ms. Um die Zeitauflösung deutlich zu verbessern, kann man Transienten bei einzelnen Wellenzahlen mit Hilfe von IR-Lasern und schnellen MCT-Detektoren messen. Diese Transienten haben eine Zeitauflösung im Bereich von Nanosekunden (ns).[56][57] Die Pump-Probe-Spektroskopie schließlich verkürzt die Zeitauflösung auf wenige 100 fs.[58]

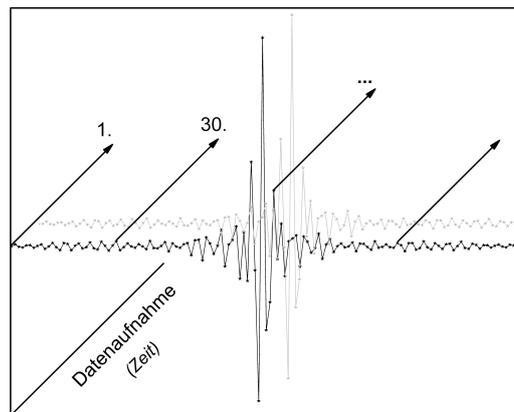


Abb. 3.14: Schematische Darstellung der Datenaufnahme in der StepScan Spektroskopie. Die Pfeile zeigen die Richtung der Messung an, aus deren Datenpunkten nach der Messung die Interferogramme entstehen (schwarze und graue Kurve).

Um ein IR Spektrum über einen weiten Wellenlängenbereich mit einer Zeitauflösung im Bereich von Nanosekunden zu erhalten, gibt es außerdem die StepScan Technik. In diesem Fall wird der Interferometerspiegel nicht länger kontinuierlich bewegt, sondern in Schritten. An jeder Spiegelposition wird die Intensität auf dem Detektor zeitabhängig gemessen und gespeichert. Am Ende der Messung wird aus den Daten Intensität, Zeitpunkt und Spiegelposition für jeden Zeitpunkt ein Interferogramm konstruiert. Der größte Nachteil dieser Methode ist, dass der beobachtete zeitabhängige Prozess mehrere 100 Male wiederholt werden muss, um die einzelnen Datenpunkte für das Interferogramm mit genügender Auflösung zu speichern. Damit sind irreversible Prozesse nur mit Hilfe von Durchflusszellen oder beweglichen Filmen messbar. Reversible Reaktionen können hingegen ohne spezielle Probenvorbereitung gemessen werden. Ein weiterer Nachteil ist die lange Dauer von mehr als einer Stunde für eine StepScan-Messung, in der die Probe ausreichend stabil sein muss, um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) zu garantieren.[59][60][61]

3.2.4 Typische IR-Banden von Proteinen und Aminosäuren

Die Infrarotspektroskopie ist eine empfindliche Methode, um einen Überblick über die dominierenden Sekundärstrukturelemente eines Proteins zu bekommen. Ein Absorptionsspektrum einer Proteinprobe besitzt auf Grund der großen Anzahl von Atomen und Schwingungsfreiheitsgraden eine extrem hohe Komplexität und einzelne Banden können kaum aufgelöst werden. Die Beiträge des Proteinrückgrats sind allerdings zumeist gut zu identifizieren. Neben der Sekundärstruktur können auch einzelne Beiträge von Aminosäuren durch geeignete Techniken beobachtet werden. Die Absorptionsbanden der Aminosäureseitenketten sind dabei sehr spezifisch.[62, 63, 64, 65]

Im mittleren Infrarot sind die Grundschnwingungen der beobachteten Schwingungen zu finden. Die Bandenposition wird durch die schwingenden Massen und durch den Bindungstyp (Einfach-, Doppel-, Dreifachbindung etc.) beeinflusst. Zusätzlich haben Wasserstoffbrücken, Donor- oder Akzeptorwechselwirkungen mit der Umgebung und die Kopplungen mit anderen Schwingungen einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum. Die Stärke der Absorption steigt mit steigender Polarität der Bindung. Damit lässt sich erkennen, dass die Proteinumgebung, z.B. Lipide oder das Lösungsmittel, genauso einen Einfluss auf die IR-Banden haben, wie die intramolekularen Wechselwirkungen. Die dominierenden Elemente im Spektrum sind jedoch die Absorptionsbanden des Proteinrückgrats, die als Amidbanden bezeichnet werden.

Tab. 3.2: Amidbanden nach [62]

Amidbande	Bandenposition in H_2O (MIR) in cm^{-1}	Zuordnung
Amid A und B	3300, 3070	s(NH)
Amid I	1650	s(C=O) (s(CN))
Amid II	1550	ν (NH), s(CN)
Amid III	1400- 1200	ν (NH), s(CN) in Phase
Amid IV bis VII	<1000	CO, CC, NH, CNC

Die Amid A und B Banden stammen von der N-H Streckschwingung der Peptidgruppe und finden sich bei 3300 cm^{-1} und 3070 cm^{-1} . Die Amid I Bande liegt bei ca. 1650 cm^{-1} und ist dominiert von der C=O Streckschwingung mit kleinen Einflüssen der restlichen Peptidbindung. Diese Bande wird am stärksten durch die unter-

schiedlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren verschiedener Sekundärstrukturelemente beeinflusst. Zudem spielt die Natur der Aminosäureseitenketten nur eine untergeordnete Rolle für die Intensität und Position der Amid I Bande. Sie wird daher hauptsächlich zur Sekundärstrukturanalyse herangezogen. In der Amid II Bande um 1550 cm^{-1} finden sich Beiträge der NH Biegeschwingung (in der Ebene) und der C=N Streckschwingung mit kleineren Einflüssen von C=O, C-C und N=C Schwingungen. Diese Bande ist sehr sensibel für den Austausch der Protonen der Peptidgruppe („Deuterierung des Proteins“). Beim Austausch von H gegen D wird die C=N Schwingung von der NH Schwingung entkoppelt und die Amid II Bande verschiebt sich nach $1490 - 1460\text{ cm}^{-1}$. Dadurch kann man Rückschlüsse auf die Zugänglichkeit des Proteinrückgrats für das Lösungsmittel gewinnen. Die einzelnen Aminosäureseitenketten haben einen geringen Einfluss auf die Amid II Bande. Die Amid III Bande zwischen 1400 und 1200 cm^{-1} setzt sich aus der NH Biegeschwingung, der C=N Streckschwingung und CC Schwingungen zusammen. Durch den Einfluss der Seitenketten ist diese Bande deutlich komplexer und schwerer zu interpretieren, allerdings kann sie dennoch für Sekundärstrukturanalysen benutzt werden.

Die verschiedenen Sekundärstrukturbeiträge zu den Amidbanden sind spezifisch genug, um in einem IR-Spektrum zwischen α -Helix, β -Faltblatt, Loops und ungeordneter Struktur zu unterscheiden. Dabei konzentriert man sich zumeist auf die Amid I Region. Die Unterschiede in der Bandenposition verschiedener Sekundärstrukturen und die Spezifität der Amid I Bande können zur Zeit am besten mit Hilfe der Kopplung von Übergangsdipolmomenten der Amid-Gruppe erklärt werden.[66, 67, 68, 69] Da die resonante Interaktion der Amid-Gruppen von ihrem Abstand und ihrer Orientierung zueinander abhängt, ist es ersichtlich, dass eine Helix oder eine Faltblattstruktur andere Kopplungen zeigen.

Tab. 3.3: Banden verschiedener Sekundärstrukturelemente nach [62]

Sekundärstruktur	Bandenposition in H ₂ O in cm^{-1}	kompletter Bereich in cm^{-1}
α -Helix	1654	1648-1657
β -Faltblatt	1633	1623-1641
	1684	1674-1695
Schleifen	1672	1662-1686
ungeordnete Struktur	1654	1642-1657

Die Aufspaltung der β -Faltblatt Bande in zwei weit voneinander entfernte Maxima lässt sich ebenfalls über gekoppelte Oszillatoren erklären. Wenn man das Problem auf zwei Oszillatoren reduziert, so gibt es zwei verschieden angeregte Zustände abhängig davon, ob die Oszillatoren in Phase schwingen oder nicht. Diese Excitonenkopplung sorgt für eine Aufspaltung der Bande mit einem Abstand von bis zu 70 cm^{-1} in der Faltblattstruktur.

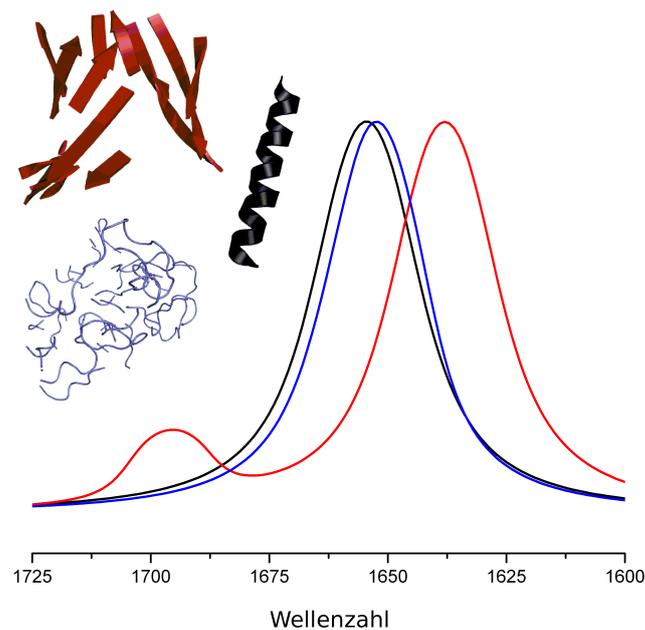


Abb. 3.15: Schematische Darstellung der IR-Absorptionsbanden verschiedener Sekundärstrukturelemente im Bereich der Amid I Bande. Es wird ersichtlich, dass α -Helix und ungeordnete Struktur nur schwer zu unterscheiden sind.

In Abbildung 3.15 werden exemplarisch die Absorptionsbanden der reinen Sekundärstrukturelemente gezeigt. Dieses Bild verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von ungeordneter Struktur und α -Helix bei der Analyse von Amid Banden. Zusätzlich finden sich in einem typischen Proteinspektrum zumeist mehrere sich überlagernde Banden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente. Um diese aufzulösen, verwendet man zuerst die zweite Ableitung, um die Bandenpositionen zu bestimmen und nutzt diese Information zusammen mit einer empirischen Halbwertsbreite, um die Amid I Bande aus Banden der einzelnen Komponenten zusammensetzen.[70, 71] Damit lässt sich nicht nur die Sekundärstruktur bestimmen, sondern die IR-Spektroskopie bietet auch eine Möglichkeit, deren zeitliche Änderung bei Faltungsprozessen oder der Denaturierung zu verfolgen. Ebenso ist es

möglich, kleine Strukturänderungen während eines Reaktionszyklus oder bei der Bindung eines Liganden zu beobachten.[72]

Neben den Amidbanden des Proteinerückrats sind vor allem die Schwingungen einzelner Aminosäureseitenketten von Interesse. Gerade bei Membranproteinen wie PR, die Protonen transportieren, ist es interessant, den Protonierungszustand der Seitenketten zu verfolgen. Die beiden wichtigsten Aminosäuren dafür sind Glutaminsäure (Glu) und Asparaginsäure (Asp), deren -COOH/COO^- -Gruppen dezidierte Signale liefern. Während die protonierte Form ein Carbonylsignal oberhalb 1700 cm^{-1} zeigt, liegt das Signal der symmetrischen Schwingung der COO^- -Gruppe bei etwa 1400 cm^{-1} .

Tab. 3.4: Banden wichtiger Aminosäureseitenketten [62]

Amid Bande	Bandenposition(en) in cm^{-1}	beteiligte Schwingungen
Asp, ν (C=O)	1716	in Proteinen auch deutlich höher (bis 1762 cm^{-1})
Glu, ν (C=O)	1712	ohne H-Brücke ebenfalls bis zu 50 cm^{-1} höher
Asp, ν_{as} (COO^-)	1572-1579	wenn die Gruppe ein Metallion koordiniert, kann die Bande stark schieben
Asp, ν_s (COO^-)	1402	kann unter den gleichen Bedingungen stark schieben wie die asymmetrische Schwingung
Lys, δ_s (NH_3^+)	1626-1629	
Tyr-OH, ν (CC)	1516-1518	

Die Region oberhalb von 1700 cm^{-1} ist deshalb interessant, da sich dort außer den Absorptionen anderer Carbonylgruppen (z.B. von Lipiden) keine weiteren Signale finden. Damit lässt sich die (De-)Protonierung von Asp und Glu dort mit Hilfe von Differenzspektren gut verfolgen. Zwischen 1500 und 1700 cm^{-1} finden sich neben den Amidbanden auch verschiedene Beiträge von Aminosäureseitenketten. Vor allem C=C und -NH_3^+ Schwingungen von Lys, Tyr, Gln und Trp sind in diesem Spektralbereich zu finden. Unterhalb der Amid I und II Region finden sich sowohl die Beiträge von Alkylgruppen und der OH-Schwingung als auch eine Vielzahl weiterer Beiträge. Auf Grund der komplexen Bandenstruktur sind IR-Spektren zwar sehr spezifisch, aber die einzelnen Banden können nur schwer einer bestimmten Schwingung im Mo-

lekül zugeordnet werden. Vor allem der Unterschied in der Dielektrizitäts-Konstante des umgebenden Mediums (80 für Wasser und ca. 3-4 für Protein), die verschiedenen Wasserstoffbrücken und koordinierte Ionen können IR-Banden stark verschieben. Damit können die Absorptionsspektren von einzelnen Aminosäuren in Wasser nur bedingt mit den Signalen der Aminosäure in der Peptidkette verglichen werden. Bei der Interpretation von Spektren ist es daher häufig notwendig einzelne Aminosäuren in einem Protein zu mutieren um Banden eindeutig zuzuordnen.

3.2.5 Käfigverbindung zur gezielten Reaktionskontrolle

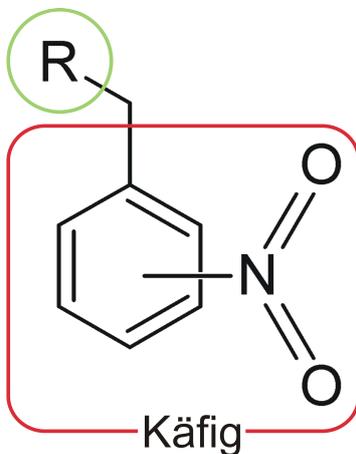


Abb. 3.16: Nitrophenylkäfig

Eine bewährte Technik in der Spektroskopie ist die Verwendung von Käfigverbindungen, um gezielt durch Photochemie ein Effektormolekül freizusetzen. Dabei können so unterschiedliche Methoden, wie die IR-Spektroskopie oder die zeitaufgelöste Röntgenkristallstrukturanalyse von den Käfigverbindungen profitieren. In der Vergangenheit wurden verschiedenste Beispiele wie 'caged-Protonen', 'caged-ATP' oder 'caged-O₂' verwendet, um zeitaufgelöste IR-Spektren dynamischer Prozesse zu gewinnen.[73, 74, 75, 76, 77, 78, 79] Üblicherweise bestehen diese photoaktiven Käfigverbindungen aus einer Nitrophenylgruppe (der "Käfig"), die als Abgangsgruppe dient

und dem kovalent gebundenen Substrat für die zu untersuchende Reaktion. Die wichtigsten Kriterien für eine gute Käfigverbindung laut [80] sind:

- Schnelle und saubere Photoreaktion mit hoher Quantenausbeute;
- Die Nebenprodukte sollten transparent bei der Anregungswellenlänge sein und möglichst inert;
- Die Freisetzung des Substrat muss deutlich schneller sein als die Reaktion, die damit ausgelöst wird;
- Die Käfigverbindung muss löslich sein;

- Die Käfigverbindung darf vor der Photolyse nicht aktiv sein;

Durch Anregung mit Laserlicht im UV Bereich kann die kovalente Bindung zum Substrat gebrochen werden und das Molekül zerfällt in zwei Teile. Der Nitrophenylrest ist im allgemeinen inert gegenüber weiteren Reaktionen und stört die Reaktion nur gering. Allerdings kann er durch seine geringe Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln durch das Ausbilden einer zweiten Phase zu Problemen führen. Dennoch ist dieses System gerade in Kombination mit der IR-Differenztechnik eine interessante Anwendung. Vor allem da die Signale des Käfigs bis auf die direkt an der Bindung beteiligten Schwingungen spektroskopisch still bleiben, können die gemessenen IR-Spektren durch die Korrektur mit dem reinen Käfig-Differenzspektrum leicht vereinfacht werden.

Im Prinzip erlaubt die Verwendung einer Käfigverbindung damit die Freisetzung eines Substrats zu einem genau definierten Zeitpunkt (Laserblitz). Die entstehenden Banden können mit Hilfe der IR-Spektroskopie verfolgt werden. Da der photochemische Bindungsbruch sehr schnell erfolgt, ist die Freisetzung des Substrats auf einer Subnanosekunden-Zeitskala zu erwarten. Damit können in der Rapid-Scan IR-Spektroskopie (Zeitauflösung im ms-Bereich) die Banden durch Schwingungen des Käfigmoleküls als konstant angesehen werden und auch aus den zeitabhängigen Prozessen herausgerechnet werden.

3.2.6 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Methode, mit der die optische Aktivität asymmetrischer Moleküle in Lösung untersucht werden kann. Dazu wird zirkular polarisiertes Licht durch eine Probe gelenkt und die Absorption dieses Lichts abhängig von der Wellenlänge detektiert. Das CD-Signal berechnet sich aus der Differenz in der Absorption von rechts und links polarisiertem Licht.

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (3.9)$$

$$\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R)cd \quad (3.10)$$

$$\Theta = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \quad (3.11)$$

$$\Theta = 32,98\Delta A \quad (3.12)$$

A	Absorption
Θ	Elliptizität
c	Konzentration
d	Schichtdicke
a,b	Achsen des Ellipsoids des circular polarisierten Lichts nach Durchtritt durch die Probe
ϵ	Extinktionskoeffizient

Die Elliptizität (Θ) wird häufig an Stelle der Absorptionsdifferenz als Messgröße benutzt. Der Zusammenhang zwischen Θ und ΔA wird durch die Definition der Elliptizität mit ΔA_L und ΔA_R hergestellt. Durch Umformungen und die Entwicklung in einer Taylor-Reihe wird der Zusammenhang auf einen konstanten Faktor reduziert. Da es sich bei der Methode um die Messung einer Absorptionsdifferenz handelt, ist es nicht verwunderlich, dass die Signalintensität um den Faktor 10^{-4} kleiner ist als in der UV/Vis-Spektroskopie und empfindliche Detektoren erforderlich sind. Üblicherweise wird dabei das Licht zunächst linear polarisiert und dann die Polarisationssebene mit Hilfe eines Photoakustischen Modulators periodisch gedreht. Die Modulation kann auch durch ein isotropes Material, das mit einem Piezoelement gekoppelt ist und durch ein alternierendes elektrisches Feld mit typischerweise 50 kHz deformiert wird, erreicht werden.[81, 82, 83]

Im Unterschied zur klassischen Absorptionsspektroskopie mit unpolarisiertem Licht sorgt die Polarisierung in der CD Spektroskopie dafür, dass nur asymmetrische Elemente der Probe zum Spektrum beitragen. Das Licht kann, wie in Abbildung 3.17 in I gezeigt, in einen rechts und links polarisierten Anteil zerlegt werden. Wenn man in die Lichtquelle blickt, würden sich die beiden Vektoren im bzw. gegen den Uhrzeigersinn drehen. Symmetrische Schwingungen absorbieren nun gleichermaßen diese beiden Anteile und sind daher nicht als Banden im CD-Spektrum zu sehen. Erst bei asymmetrischen Molekülen wie z.B. einem Enantiomerenpaar findet man Banden im CD-Spektrum. Gerade für die Trennung und Identifizierung von Enantiomeren ist die CD-Spektroskopie enorm wichtig, da die meisten physikalischen Eigenschaften von Enantiomeren identisch sind.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Methode ist die Sekundärstrukturanalyse von Proteinen in Lösung. Die Absorptionsbande der Peptidbindung liegt im Bereich von <240 nm. Hierbei sind hauptsächlich die schwache aber breite Bande des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei 220 nm und der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 190 nm erwähnenswert. Durch

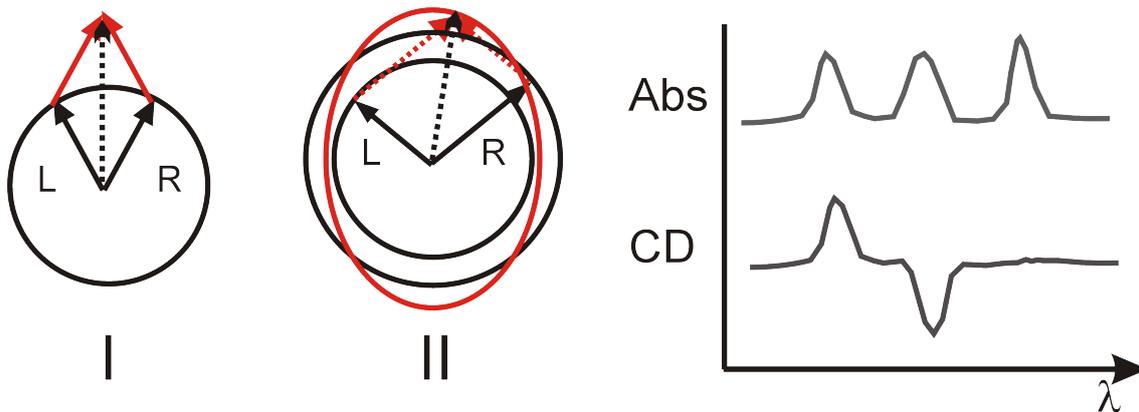


Abb. 3.17: In I sind die rechts und links polarisierten Komponenten des circular polarisierten Lichts gezeigt. Beide haben die gleiche Amplitude. Beim Durchtritt durch ein chirales Medium (II) werden die Komponenten unterschiedlich stark absorbiert und es entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Rechts ist ein Vergleich zwischen Absorptionsspektroskopie und CD-Spektroskopie zu sehen. Eine Absorptionsbande kann ein positives (L stärker absorbiert) oder negatives (R stärker absorbiert) CD-Signal haben, wenn ihr Ursprung eine asymmetrische Gruppe ist. Für symmetrische Gruppen gibt es hingegen kein CD-Signal (nach [81])

die Orientierung der Peptidgruppe in den verschiedenen Sekundärstrukturen ergeben sich charakteristische CD-Banden. Neben den Peptidgruppen kann man auch Signale der aromatischen Aminosäuren (260 - 320 nm) oder Signale von Kofaktoren wie Flavinen oder Hämgruppen im CD-Spektrum finden.

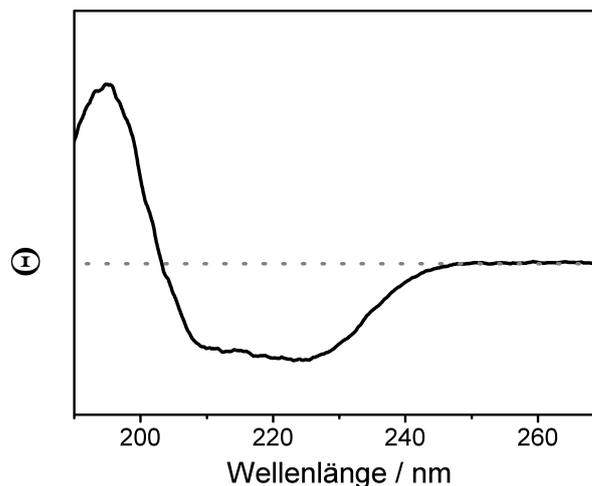


Abb. 3.18: CD-Spektrum eines α -helikalen Proteins

Das CD-Spektrum in 3.18 zeigt die typischen Banden im UV CD-Spektrum eines α -helikalen Proteins. Die Banden bei (-)209, (-)222 und (+)195 nm gehören zum $\pi \rightarrow \pi^*$ -

Übergang (parallel), dem $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang und dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang (antiparallel). Während die α -Helix leicht zu identifizieren ist, kann die Unterscheidung zwischen dem antiparallelen β -Faltblatt, Schleifen und der ungeordneten Struktur zum Teil Schwierigkeiten bereiten. Damit ergänzen sich IR- und CD-Spektroskopie hervorragend, um sowohl das β -Faltblatt, als auch die α -Helix in einem Protein zu quantifizieren. Die Analyse der CD-Spektren kann qualitativ und quantitativ erfolgen. Wenn der prozentuale Anteil der Sekundärstrukturen ermittelt werden soll, so werden Datenbanken mit ausgewählten Referenzproteinen zu Rate gezogen. Dabei geht man davon aus, dass ein CD-Spektrum im Bereich der Peptidabsorption (C_λ) durch die Linearkombination der Spektren der einzelnen Sekundärstrukturelemente ($B_k\lambda$) ausgedrückt werden kann.

$$C_\lambda = \sum f_k B_{k\lambda} \quad (3.13)$$

Mit Hilfe der Referenzdatenbank und numerischer Verfahren kann so eine verlässliche Abschätzung zur Sekundärstruktur durchgeführt werden.

3.3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, vorhandene spektroskopische Methoden zu benutzen und zu erweitern, um ein besseres Verständnis von Proteorhodopsin und RuBisCO zu gewinnen. Beide Proteine sind an Schlüsselschritten der biologischen Energiegewinnung beteiligt. Proteorhodopsin generiert einen Protonengradienten in Archeabakterien, die den Hauptteil der Energie in der phototrophischen Zone der Ozeane erzeugen. RuBisCO hingegen katalysiert den ersten Schritt der Photosynthese in Pflanzen und ist das Enzym mit der größten Biomasse überhaupt. Trotz dieser herausragenden Stellung im ökologischen System gibt es immer noch große Lücken in unserem Verständnis der Funktion.

Mit Hilfe von zeitaufgelöster und Tieftemperatur IR-Spektroskopie sollte ein Einblick in die am Protonentransport beteiligten Aminosäuren des Proteorhodopsins gewonnen werden. Vor allem der aktuell kontrovers diskutierte Photozyklus bei sauren pH-Werten bietet viele Ansatzpunkte. Die Existenz eines M-Intermediats im Photozyklus bei pH 5 sollte mit der IR-Spektroskopie überprüft werden. Zusätzlich sollte das Setup für die Tieftemperaturmessungen um die Einkopplermöglichkeit eines UV/VIS-Faserspektrometers erweitert werden, um simultan IR- und UV/VIS-Spektren der Proben aufnehmen zu können. Dadurch können die Photozyklusintermediate besser identifiziert werden. Mit Hilfe von IR- und CD-Spektroskopie sollte zudem die Funktionalität einer neuartigen PR Probenform - 2D Kristalle - getestet werden, bevor diese für weitere spektroskopische Studien verwendet werden.

RuBisCO erwies sich in der Vergangenheit immer wieder als schwer zu fassendes System und seine Untersuchung wird erschwert durch die kompetitive Hemmung des Enzyms durch sein Substrat (RuBP), Azid, Phosphat und weitere. Selbst Aktivitätsmessungen erweisen sich als Herausforderung und sind bisher nur mit ^{14}C -markiertem CO_2 möglich. Trotz einer Vielzahl von vorhandenen Kristallstrukturen von verschiedenen Schritten im Katalysezyklus ist die Aktivierung des Enzyms immer noch nicht klar charakterisiert. In dieser Arbeit sollte daher eine Methode entwickelt werden, um die Carbamatbildung im aktiven Zentrum von RuBisCO spektroskopisch zu verfolgen. Dazu wurde eine Käfigverbindung, ein CO_2 -Käfig (m-Nitrophenylacetat), verwendet. Die Käfigverbindung sollte ausführlich charakterisiert und an Hand von Modellsystemen getestet werden. Anschließend sollte die Aktivierung von RuBisCO nach der genau definierten Freisetzung des Substrats mit Rapid Scan FTIR Spektroskopie beobachtet werden. Vor allem der Einfluss von Ma-

gnesiumionen auf die Carbamatbildung und deren Hemmung durch Azid sollten gezielt verfolgt werden. Gleichzeitig dient RuBisCO als Modellsystem für biologisch bedeutsame Carboxylierungen: die neue Methode sollte sich dann auf eine ganze Klasse von Enzymreaktionen anwenden lassen.

4 Material und Methoden

4.1 Enzympräparation

4.1.1 Herstellung der Proteorhodopsin-Proben

Alle Proteorhodopsinproben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Glaubitz, Universität Frankfurt, hergestellt und in folgendem Puffer übergeben: 50 mM Tricine, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM NaN₃, 5 mM DTT, pH 8,5, 7,5 % MPD. Die Präparation erfolgte nach [84, 22]. Proben wurden sowohl in solubilisierter und in rekonstituierter Form als auch als 2D-Kristalle präpariert. Für die rekonstituierten Proben (PRrek) und die 2D Kristalle (PR2D) wurde 1,2-Di-oleoyl-glycero-phosphatidyl-cholin (DOPC) als Lipid verwendet.

4.1.2 Herstellung der RuBisCO-Proben

RuBisCO wurde in leicht abgewandelter Weise nach [85] präpariert. Es wurden die Puffer und Lösungen aus der Übersichtstabelle verwendet. Die Hälfte von Puffer 1 wird eingefroren und mit der flüssigen Hälfte gemischt, um eine genügend niedrige Temperatur bei der Präparation zu erreichen. Bei ca. 250 g frischem Spinat werden die Stiele von den Blättern entfernt, mit dem Puffer gemischt und im Mixer zerkleinert, bis eine homogene Masse entsteht. Diese Masse wird durch eine Feinstrumpfhose gefiltert. Die Flüssigkeit wird für ca. 7 Minuten bei 4°C und 1000 g zentrifugiert. Um die zellulären Bestandteile noch besser heraus zu filtern, kann man vor diesem Schritt bereits eine Zentrifugation für ca. 1 Minuten bei 200 g durchführen. Die Pellets werden dann in der 2. Lösung aufgelöst, um die Chloroplasten durch einen osmotischen Schock zu zerstören. Dieser Effekt wird noch verstärkt, indem man die Probe für ca. 15 Minuten in ein Ultraschallgerät legt. Hierbei sollte die Probe in Eiswasser stehen, um eine möglichst niedrige Temperatur zu garantieren. Die Lösung mit der freien RuBisCO wird nun in der Ultrazentrifuge für ca. 25 Minuten mit 25 000 U/min (60 Ti Rotor) zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich nun freie RuBisCO befindet, kann nun chromatografiert werden.

Tab. 4.1: Puffer und Lösungen für die RuBisCO Präparation, Puffer 1 hat einen pH von 6.5, Lösung 2 8,0, Puffer A und Puffer B haben ebenfalls einen pH-Wert von 8,0.

Puffer/Lösung	Chemikalien	Menge in mM
Puffer1	Kaliumdiphosphat	10
	Sorbitol	330
	Magnesiumchlorid	4
	Ascorbinsäure	2
Lösung 2	Tricine NaOH	5
	DTT	4
Puffer A	Tris HCl	20
	DTT	1
Puffer B	Tris HCl	20
	DTT	1
	Kaliumchlorid	1000

Hierbei wird von der Probe ca. 200 ml auf die Säule (100 ml Q-Sepharose; Anionentauscher) aufgetragen. Anschließend wird die Säule mit 100 ml von Puffer A gespült. Danach wird die Konzentration des Puffers B so lange erhöht, bis sie nach 600 ml bei 60 % liegt. Gesammelt wird dabei ab dem Moment, ab dem die Konzentration von Puffer B steigt, bis zu dem Moment, bei dem die endgültige Konzentration des Puffers erreicht ist. Es werden dabei je 3 ml-Fraktionen gesammelt. Aktivitätsmessungen zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit des Proteins wurden nicht durchgeführt, da für den Aktivitätstest radioaktiv markiertes CO₂ erforderlich ist. Allerdings zeigt die Gelchromatografie einen Peak für die RuBisCO-Probe bei den richtigen molaren Massen für beide Untereinheiten.

4.2 Probenvorbereitung

Alle Proteinproben müssen vor der Verwendung aus den Elutionspuffern in Messpuffer überführt werden. Dadurch werden unerwünschte Signale durch Additive aus der Präparation vermieden und der pH-Wert kann variiert und überprüft werden. Zusätzlich werden Teile der Messungen bei pH-Werten durchgeführt, die die Stabili-

tät der verwendeten Proteine gefährden. In solchen Fällen wird die Probe direkt vor der eigentlichen Messung umgepuffert.

Probenvorbereitung für RuBisCO und Käfig-CO₂ Das Protein wurde dabei in Amicon-Ultra Zentrifugeneinheiten von Millipore (50 kD Ausschlussgröße) aufkonzentriert, mit dem Messpuffer verdünnt und erneut aufkonzentriert. Dieser Prozess wurde mindestens dreimal wiederholt, um einen möglichst vollständigen Austausch der Puffer zu gewährleisten. Für den Messpuffer wurde eine genügend hohe Pufferkonzentration gewählt (mindestens 10fach höher als die Probenkonzentration, zumeist allerdings >100fach höher), um den pH-Wert konstant zu halten.

RuBisCO kann nur für die allgemeine Charakterisierung in Phosphatpuffer gemessen werden. Alle Untersuchungen zur Aktivierung und Aktivität müssen phosphatfrei gemacht werden, da Phosphat ein Inhibitor für RuBisCO ist. Als Puffersystem mit einem pK_a -Wert von 7,55 wurde daher 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) verwendet. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt bei einer Konzentration von 100 mM. Die Käfigverbindungen *o,m,p*-Nitrophenyllessigsäure wurden direkt in Wasser oder Puffer gelöst. Messungen, die ohne RuBisCO durchgeführt wurden, erfolgten in 100 mM Phosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten. Für alle anderen Messungen, die Käfig-CO₂ und Proteine beeinhalteten, wurde ein Standardpuffer mit 10 mM Käfig-CO₂, 100 mM HEPES bei pH 7,5 hergestellt.

Für die Untersuchungen der Käfigverbindungen und RuBisCO wurden Küvetten aus CaF₂ mit einer Schichtdicke von 10 μm und einem Volumen von 1 μl verwendet. Die Fenster wurden am Rand mit einem Film aus Siliconöl versiegelt, um einen Austausch von Gasen mit der Umgebung und das Austrocknen der Probe zu vermeiden. Wie in Abbildung 4.1 zu erkennen ist, wird das Fenster durch eine verschraubbare Metallhülse zusammengedrückt und kann in den temperierbaren Probenhalter geschraubt werden.

Probenvorbereitung für PR Durch die großen Aggregate in den rekonstituierten Proben und die Verwendung von 2D-Kristallen wurde keine Zentrifugeneinheit benötigt. Die Proben wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Zentrifuge sedimentiert, der Elutionspuffer wurde herauspipettiert und durch den Messpuffer ersetzt. Auch hier wurde das Verfahren mindestens dreimal wiederholt. Der pH-Wert

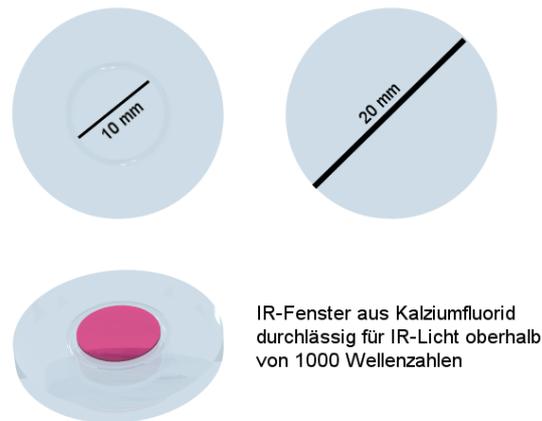


Abb. 4.1: Die Küvette aus zwei CaF_2 -Fenster, setzt sich aus einem Fenster mit Graben und einem Deckfenster zusammen. Der Graben ist ca. 1 mm breit und die innere Fläche ist leicht vertieft. Durch die Vertiefung und das Deckfenster wird ein Probenvolumen von $1 \mu\text{l}$ eingeschlossen und der Graben verhindert ein Auslaufen der Probe.

der Proben wurde bei den PR Proben durch optische Spektroskopie kontrolliert. Für die Rapid-Scan IR-Messungen mit PR wurden sowohl Grabenküvetten für hochviskose Lösungen und Proteinfilm verwendet, als auch zwei Fenster, die durch einen Dichtungsring auf Abstand gehalten werden. Eine hohe Proteinkonzentration ist notwendig, um ein ausreichend gutes Signal-Rausch-Verhältnis für die Spektroskopie zu bekommen. Retinalproteine sind auch in hohen Konzentrationen relativ stabil und sind in ihrer nativen Umgebung häufig in hohen Konzentration von bis zu 90 % Anteil an der Zellmembran zu finden. Daher kann PR als hydratisierter Film auf Calciumfluorid Scheiben aufgetrocknet werden. Die Proteinfilm wurden für die verschiedenen Messverfahren mit kleinen Variationen präpariert. Für Tieftemperaturmessungen wurden $6 - 10 \mu\text{l}$ einer hochkonzentrierten PR-Lösung auf einem CaF_2 -Fenster mit 15 mm Durchmesser kreisförmig aufgetragen. Der Filme wurde abgedeckt, in 30 min getrocknet und anschließend durch Anhauchen befeuchtet. Die Kontrolle des Hydratisierungsgrads und pH-Werts wurde mit IR- und Vis-Spektroskopie erreicht.

Die Messzelle mit einem Dichtungsring als Abstandhalter hat einen Fensterabstand von ca. 2 mm um im Inneren außerhalb des Strahlengangs einen Tropfen einer 70/30-Mischung aus Messpuffer und Glycerol zu deponieren. Diese kleine Flüssigkeitsmenge sorgt für eine 95 % Luftfeuchtigkeit im Inneren und damit für eine definierte Hydratisierung des Proteinfilms.

Die CD-Messungen wurden sowohl in den IR-Messzellen mit den Grabenfenstern oder einem Abstandshalter aus Teflonfolie durchgeführt, als auch in den klassischen

CD-Küvetten von JASCO (Groß-Umstadt). Für die Vis-Spektren wurden Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Für die Ultrazentrifugation wurde die Probe in eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt.

Tab. 4.2: Verwendete Puffersysteme für die IR-/CD-/VIS-Spektroskopie

Puffertyp	pH-Werte	Konzentration in mM	Anwendungsbereich
Phosphatpuffer (NaP_i)	5,1/5,5/8,5/9,0	100	IR-/CD-/Vis-Spektroskopie (PR,Käfigverbindungen)
Phosphatpuffer mit Sucrose	5,1/9,0	100 NaP_i / 23.5 % Sucrose	Ultrazentrifugation (PR)
Phosphatpuffer mit NaCl	5,1/5,5/8,5/9,0	100 NaP_i / 100 NaCl	IR-Spektroskopie (PR,Käfigverbindungen)
TRIS-Puffer	7,0/8,0/8,5	100	IR-Spektroskopie RuBis- CO
Molybdatpuffer mit NaCl	5,0	100 NaMoO_4 / 100 NaCl	IR-Spektroskopie (PR)

4.3 Verwendete Spektrometer, Parameter und Datenanalyse

IR-Daten Die in der Arbeit gezeigten IR-Daten wurden immer mit Hilfe der *OPUS* Software von Bruker aufgenommen. Ein typisches Absorptionsspektrum wurde im Bereich von 1000 bis 2500 cm^{-1} mit 4 cm^{-1} Auflösung und als Mittelungen aus 512 Interferogrammen aufgenommen. Der Bereich variiert abhängig von den zu erwartenden IR-Signalen. Für die Rapid-Scan Messungen mit PR wurde ein IFS 66 (V/S) Spektrometer von Bruker verwendet, dessen Probenkammer im Institut modifiziert wurde. Zur Anregung der Probe wurde ein Nd:YAG-Laser (Ultra, Big Sky Technologies, Inc., Bozeman) über ein Prisma und zwei Spiegel durch ein Quarzfenster in das Spektrometer eingekoppelt. Die Anregungswellenlänge lag bei 532 nm mit 45 mJ in einem 9 ns Puls fokussiert auf einen 4 mm^2 großen Bereich. Mit Hilfe der *OPUS* Software konnten Rapid-Scan-Spektren mit 75 ms Zeitauflösung und 4 cm^{-1} Auflösung im Bereich von 1150 bis 2000 cm^{-1} gemessen werden. Dabei wurde der Laserpuls vom Spektrometer ausgelöst und es wurden typischerweise 10x10 Spektren vor der Anre-

gung und 50x1 Spektren danach gespeichert. Die gesamte Messung wurde bis zu 100x wiederholt.

Die weitere Datenverarbeitung wurde mit Matlab durchgeführt. Die einzelnen 3D-Spektren werden Basislinien korrigiert und dann gemittelt. Die Basislinienkorrektur entspricht dabei einer einfachen Offset-Korrektur durch die Bestimmung des mittleren Offsets zwischen 2360 cm^{-1} und 2500 cm^{-1} . Der Bereich wurde gewählt, da dort keine Differenzbanden für die untersuchten Systeme erwartet werden. Aus dem erhaltenen 3D-Datensatz können anschließend sowohl einzelne Spektren, als auch Transienten bei spezifischen Wellenzahlen extrahiert werden. Die Zeitkonstanten für den Photozyklus wurden durch die Anpassung exponentieller Funktionen ($y = Ae^{Bx}$) mit Matlab oder Origin bestimmt.

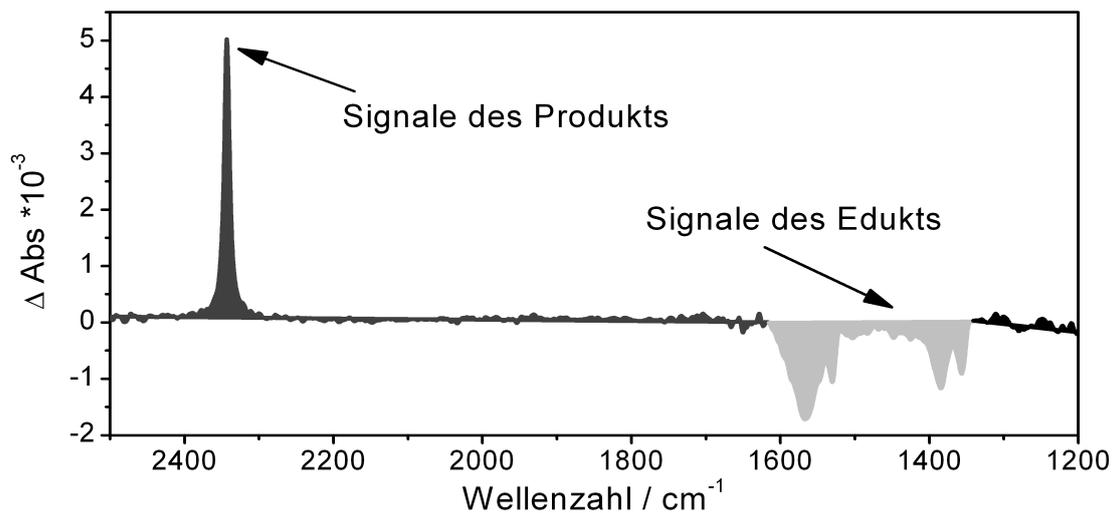


Abb. 4.2: Die Abbildung zeigt ein typisches IR-Differenzspektrum. Das schwarz eingefärbte Signal resultiert aus Veränderungen in der Probe, durch die induzierte Änderung entstehen. Die negativen grauen Signale stammen von Schwingungen, die im Ausgangszustand vorhanden waren und durch die induzierte Änderung verschwinden bzw. ihre Frequenz ändern.

Die erhaltenen Spektren werden als Differenzspektren bezeichnet, wenn als Hintergrund das Einkanalspektrum der Probe verwendet wird. Daher sind die Spektren vor der Anregung effektiv Basislinien mit dem Grundrauschen, da die Signale des Proteins und des Lösungsmittels gleichermaßen in beiden Einkanalspektren existieren. Im Moment der Anregung beginnt der Photozyklus des Proteins und eine Mischung aus negativen und positiven Signalen wird sichtbar (vgl. 4.2). Die positiven Signale stammen von Schwingungen, die einzigartig für den Zustand der Probe nach der Anregung sind, während negative Signale zu Schwingungen gehören, die von der Probe

im ursprünglichen Zustand stammen und ihre Bandenposition geändert haben oder durch einen Bindungsbruch nicht mehr existieren. Das Prinzip der Differenzspektren lässt sich allerdings nicht nur auf optisch induzierte Änderungen in Proteinen reduzieren, sondern wird generell angewandt, wenn kleine Signale auf einem großen Hintergrund beobachtet werden sollen. Wichtig ist es dabei, eine Änderung in der Probe während der Aufnahme von I_0 und I auszulösen. Im Fall von PR ist das die Anregung des Retinals und damit der Start des Photozyklus. Für die Käfigverbindungen und RuBisCO ist die photochemische Freisetzung von Kohlendioxid die induzierte Änderung.

Die Rapid-Scan Spektren der Käfigverbindungen und RuBisCO wurden mit einer höheren Zeitauflösung (10 ms) zwischen den einzelnen Spektren gemessen. Der Wellenlängenbereich umfasste 1000 bis 2500 cm^{-1} , um auch die CO_2 -Bande aufzulösen. Die Messungen wurden an einem modifizierten IFS 66 der Firma *Bruker* durchgeführt, von dem allerdings nur das Interferometer und die Elektronik übernommen wurde. Gehäuse und Probenhalter wurden speziell angefertigt. Der Probenhalter ist ein Probenwechsler, der bis zu 5 IR-Küvetten aufnehmen kann und durch eine elektronische Steuerung die richtige Probe in den Strahlengang fährt. Ein Excimer Laser mit einer Wellenlänge von 308 nm ist in einem Winkel von 20° auf die Probe fokussiert und wird wie bei den PR-Messungen durch das Spektrometer ausgelöst. Der Probenhalter ist auch hier temperierbar und wurde üblicherweise auf 5°C gekühlt. Da die Freisetzung des CO_2 -Moleküls ein irreversibler Vorgang ist, konnte die Messung nicht mehrfach wiederholt werden. Daher wurden zum Teil während der Datenaufnahme oder in der Nachbearbeitung mehrere Spektren gemittelt. Da für einige beobachtete Reaktionen ein nichtlinearer Zeitverlauf sinnvoll war und andere eine hohe Zeitauflösung erfordern, gibt es keine einheitlichen Angaben für die Anzahl der Spektren vor und nach der Anregung. Die Daten wurden ebenfalls mit *OPUS* aufgenommen und in Matlab und Origin weiter bearbeitet.

Die Tieftemperaturmessungen wurden ebenfalls im modifizierten IFS 66 durchgeführt. Dazu wurde ein spezieller Probenhalter eingebaut, der einen Optistat DN Kryostaten von Oxford aufnehmen konnte und an dem zusätzlich über Lichtleiter eine Quecksilber-Xenon Lampe (Hamamatsu LC 8) mit einer Thorlabs Filterkombination eingekoppelt wurde, um die Anregung der Probe mit 530 nm zu gewährleisten.

Durch die insgesamt 6 CaF_2 -Fenster verläuft sowohl der Lichtweg des IR-Spektrometers, als auch im Winkel von 10° der Lichtweg eines Vis-

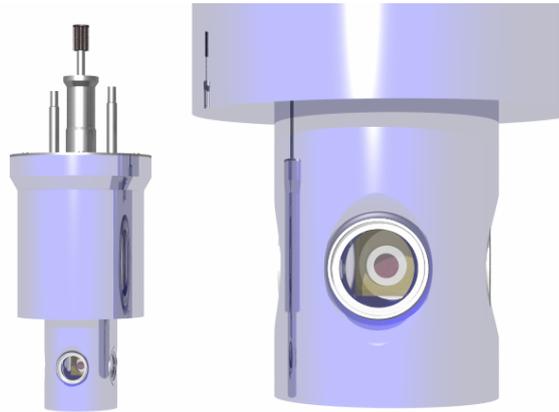


Abb. 4.3: Auf der Abbildung ist die (vereinfachte) Darstellung eines Optistat DN Kryostaten mit Probe zu sehen. Sämtliche Fenster sind aus CaF_2 . Der Probenhalter wurde speziell entwickelt um CaF_2 -Fenster mit dem PR-Film aufzunehmen.

Faserspektrometers. Dadurch können gleichzeitig IR- und Vis-Spektren aufgenommen werden.

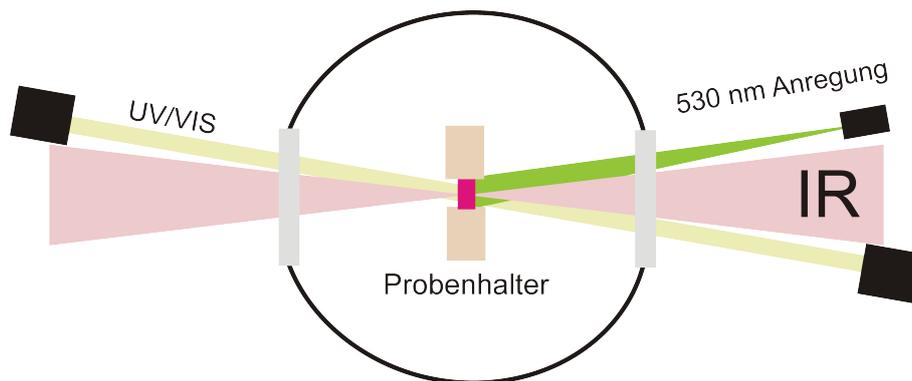


Abb. 4.4: Auf der Abbildung ist die (vereinfachte) Darstellung der Strahlengänge des IR-Lichts, des Anregungslichts und des UV/Vis-Messlichts zu erkennen. Anregung und UV/Vis-Messlicht werden durch Lichtleiter in die Probenkammer geleitet.

Der Kryostat wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt und konnte im Temperaturbereich von 310 bis 77 K eingesetzt werden. Die Belichtungszeit für die Probe betrug 60 s und es wurden wieder Differenzspektren vor, während und nach der Belichtung aufgenommen. Die Datenverarbeitung erfolgte analog der Rapid-Scan Messungen bei Raumtemperatur. Bei 77 K wurde auf Grund der fehlenden Proteinkinetik nur ein einzelnes Differenzspektrum mit 512 Mittelungen aufgenommen.

Die pH-Titration wurde mit Hilfe einer ATR-Perfusionszelle durchgeführt, die von E. Dzafic konstruiert wurde.[86] Die konzentrierte Proteinprobe wurde auf den ATR-

Kristall aufgebracht und für 10 Minuten an der Luft angetrocknet. Anschließend wurde die Zelle verschlossen und das Puffer wurde so lange über die Probe gespült, bis das Absorptionsspektrum keine Veränderung mehr zeigte. Danach wurde der Puffer gewechselt und Differenzspektren aufgenommen.

CD-Daten Die Spektren wurden mit einem kommerziellen Jasco 720 CD-Spektrometer mit einer Auflösung von 0.1 nm gemessen. Das Spektrometer wurde konstant mit mindestens $5 \frac{l}{min}$ Stickstoff gespült, um die Optik vor Verschleiß zu schützen und die Bildung von Ozon zu unterdrücken. Vor allem bei Messungen mit Wellenlängen unter 180 nm stört Ozon auch durch seine Eigenabsorption. Üblicherweise wurden 10 Messungen gemittelt, um das S/N-Verhältnis zu verbessern. Für die temperaturabhängigen Messungen wurde der Probenhalter mit einem externen Wasserbad temperiert und die Temperatur über den Computer kontrolliert. Alle 20°C wurde ein CD-Spektrum aufgenommen. Die Messzeit für eine Temperaturserie von Raumtemperatur (RT) bis 95 °C beträgt etwa 12 h.

UV/Vis-Daten Die Tieftemperatur UV/Vis-Spektren wurden mit einem im Institut gebauten Faserspektrometer aufgenommen, das über zwei Lichtleiter (100µm Durchmesser (Avantes)) in das IR-Spektrometer eingekoppelt wurde. Die Spektren wurden mit 300 ms Integrationszeit und 10 Mittelungen aufgenommen. Eine kombinierte Deuterium-Halogen-Lampe (DH-2000, Micropack Inc.) wurde als Lichtquelle verwendet um den Bereich von 250 bis 700 nm abzudecken. Die Spektren wurden einer Streukorrektur mit einer Funktion der Form $A + B \cdot \lambda_{-C}$ unterzogen um später aus den Absorptionsspektren Differenzspektren bilden zu können.

Ultrazentrifugation Für die Bestimmung der Größe der PR Aggregate, wurden 300 µl der Proteinlösung mit einer OD von etwa 0,3 bei 530 nm und einer Trübung von 0,6 bis 0,7 bei 320 nm verwendet. Die Lösung wurde mit 23,5 % Sucrose versetzt. Die Messung wurde mit einer Beckman Optima XL-A Ultrazentrifuge, einem An-50Ti Rotor und einem Epon Mittelstück mit 12 mm Schichtdicke durchgeführt. Die Rotorgeschwindigkeit lag bei 490 g und die Temperatur wurde bei konstant 20 °C gehalten. Trübung gegen den Radius wurde bei 320 nm mit einer radialen Schrittgröße von 0,03 mm gemessen. Die Daten wurden mit dem Programm SEDFIT von P. Schuck ausgewertet, wobei eine Verteilung von nicht diffundierenden Partikeln als Grundlage verwendet wird.

4.4 **Material**

Die Proteine wurden wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben vom AK Glaubitz bereitgestellt oder im Institut präpariert. Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden von verschiedenen Firmen bezogen (Sigma Aldrich für die meisten Chemikalien, Eurisotop für D₂O und andere Isotope) und - soweit nicht anders gekennzeichnet - ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für wässrige Lösungen und die Puffer wurde entionisiertes Wasser verwendet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Proteorhodopsin

5.1.1 Stabilität und Funktionalität von Proteorhodopsin 2D Kristallen

5.1.1.1 Probencharakterisierung mit VIS- und IR-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der verschiedenen Proteinpreparationen und der strukturellen Eigenheiten von Proteorhodopsin wurden eine Reihe statischer Messungen durchgeführt. PR ist ein pH-sensitives Protein und seine Funktionalität wird stark durch den pH-Wert seiner Umgebung beeinflusst. Daher muss man, um Aussagen über den Photozyklus treffen zu können, sicherstellen, dass der pH-Wert richtig eingestellt ist und durch einen Puffer während der Messung kontrolliert wird.

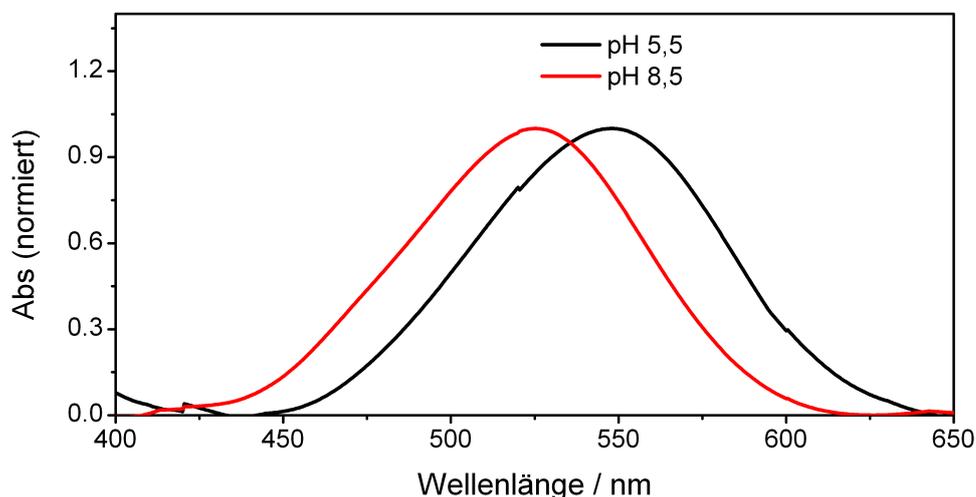


Abb. 5.1: Die schwarze Kurve zeigt einen Ausschnitt aus dem VIS Spektrum von PR2D bei pH 5,5. Das Maximum der Absorption liegt bei 548 nm und entspricht einem elektronischen Übergang des Retinals in der Bindungstasche. Bei einer pH Änderung auf pH 8,5 verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 525 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Spektren auf das Absorptionsmaximum normiert.

Die Absorptionsbande des gebundenen Chromophors liegt im sichtbaren Spektralbereich bei ca. 530 nm und ist extrem abhängig von ihrer Umgebung. Änderungen des pH-Werts sorgen für eine Verschiebung der Retinalbande zu größeren (saurer pH) oder kleineren (alkalischer pH) Wellenlängen (vgl. 5.1). Damit ist diese Bande ein intrinsischer pH-Indikator und kann zur Kontrolle des pH-Werts in situ während der Messung genutzt werden. Zusätzlich ist es hilfreich, dass freies Retinal bei etwa 380 nm absorbiert und damit hervorragend von gebundenem Retinal zu unterscheiden ist. Selbst die blauverschobenen Absorptionsbanden der Intermediate des Photozyklus sind immer noch vom freien Retinal zu unterscheiden.

Die pH-Abhängigkeit der Absorptionsbande kann durch den ungewöhnlich hohen pK_a -Wert des Protonenakzeptors ASP97 von ca. 7-8 erklärt werden. Zusätzlich muss bedacht werden, dass die spektralen Unterschiede zwischen den zwei PR Varianten grünes PR (GPR) und blaues PR (BPR) durch eine einzige Aminosäure in der Retinalbindungstasche erklärt werden kann (Leu-105/Gln-107).[87] In dieser Arbeit wird jedoch ausschließlich die grüne PR Variante untersucht und daher wird in der Nomenklatur PR synonym für das grüne PR verwendet.

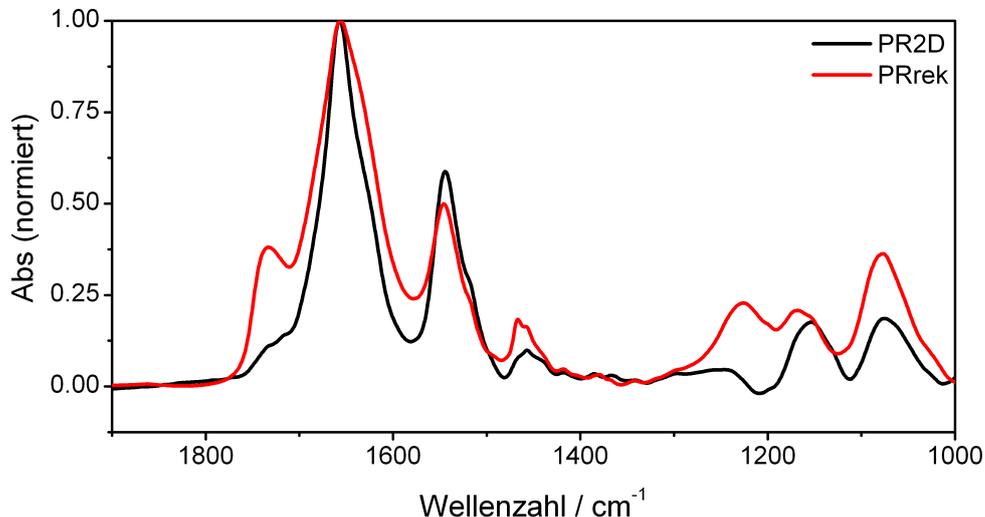


Abb. 5.2: FTIR Absorptionsspektren von PRrek und PR2D Filmen. Beide Spektren zeigen die typischen Absorptionsbanden für den Amide I (1650 cm^{-1}) und Amide II (1550 cm^{-1}) Bereich, wobei die Amid I Bande von der Wasserabsorption überlagert wird. Die beiden Banden stehen etwa im Verhältnis 2:1.

Desweiteren werden verschiedene Präparationen des PR Wildtyps verwendet, die sich in der Zusammensetzung und Konzentration der verwendeten Lipide und Deter-

genzien unterscheiden (PRsol, PRrek, PR2D). Die solubilisierten Proben stellen dabei

Tab. 5.1: Verwendete Probenformen des PR Wildtyps

Probenform	Besonderheit	Vor-/Nachteile in mM
PRsol	solubilisiert mit Detergens (DDM)	Keine Lipidbanden, artifizielle Probenform
PRrek	rekonstituiert mit DOPC Lipiden	Bildet Membran nach, Lipid-Protein-Interaktion erhalten
PR2D	geringer Lipidanteil, Proteinkristalle (Schichten)	Höchste Stabilität bei saurem pH, hohe Proteinkonzentration

die artifizielste Probenform dar. PR2D trägt der hohen Konzentration des Proteins in seiner nativen Umgebung und der Tatsache, dass Retinalproteine in Bakterien häufig als 2D Kristalle vorkommen, Rechnung. Die PRrek Proben haben eine hohe Lipidkonzentration, womit versucht wird, die Umgebung einer Membran zu simulieren.

In Abbildung 5.2 sind die Absorptionsspektren der PR Filme für verschiedene Probenpräparationen gezeigt. Die Spektren werden von den Absorptionsbanden des Proteinerückgrats dominiert. Die Amide I Bande ist zusätzlich von einer Wasserbande überlagert, allerdings ist die Wasserkonzentration in den Filmen relativ gering. Da die Kinetik und Funktionalität von PR Filmen vom Hydratisierungsgrad des Proteins abhängt, muss gewährleistet sein, dass die Filme ausreichend Wasser enthalten. Daher wurde bei der Probenpräparation darauf geachtet, einen einheitlichen Wassergehalt zu erreichen. In den Absorptionsspektren ist zudem gut erkennbar, dass die PR2D Filme deutlich geringere Mengen an Lipiden enthalten (etwa $\frac{1}{20}$ im Vergleich zu PRrek). Die Absorptionsbande der Carbonyl-Schwingung der Lipide liegt bei ca. 1730 cm^{-1} und ist dementsprechend ausgeprägter in den PRrek Filmen. Da im weiteren Verlauf nahezu ausschließlich Differenzspektren gebildet werden, bietet die geringere Lipidkonzentration einen Vorteil. Durch die geringere Grundabsorption im Bereich der Absorption von Asp und Glu -COOH Signalen (zwischen ca. $1710 - 1760\text{ cm}^{-1}$), können die für den Protonentransport so wichtigen Signale besser aufgelöst werden.

5.1.1.2 CD-Spektren und Temperaturstabilität

Die Sekundärstruktur von Proteinen kann auf vielfältige Weise charakterisiert werden, allerdings sind die Methoden meist für einzelne Strukturelemente besonders geeignet. Zumeist verwendet man daher eine Kombination verschiedener spektroskopischer Methoden, um Sekundärstrukturelemente von Proteinen zu untersuchen. Da es für PR bisher (Stand 2009) keine Struktur mit atomarer Auflösung aus der Röntgenbeugung gibt, muss man auf andere Techniken ausweichen, um Struktur und Funktionalität zu verbinden. Für ein α -helikales Protein wie PR ist die CD-Spektroskopie auf Grund der eindeutigen Banden als Untersuchungsmethode sehr gut geeignet. Das Homologiemodell auf Basis einer BR Struktur sagt eindeutig 7 transmembrale Helices voraus. Diese sollten in einem CD Spektrum über ein klares Bandenmuster erkennbar sein.

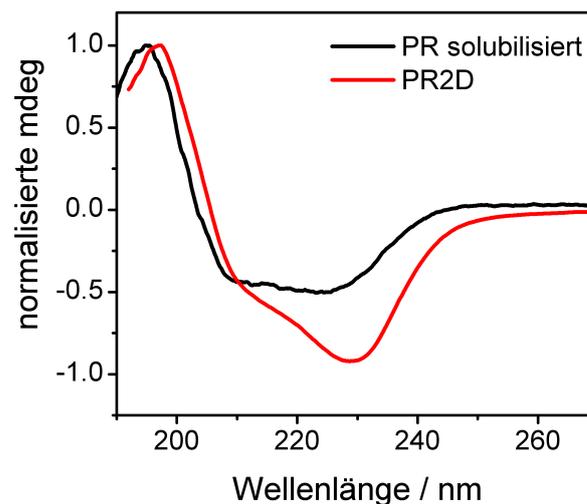


Abb. 5.3: Die Abbildung zeigt einen Vergleich der CD-Spektren von PR2D (rote Kurve) und solubilisiertem PR (schwarze Kurve) bei Raumtemperatur. Für die solubilisierte Probe sind die Bandenpositionen kongruent mit einer α -helikalen Struktur. PR2D hat hingegen noch ein zusätzliches Strukturelement.

In Abbildung 5.3 ist ein CD-Spektrum für eine in Detergens solubilisierte PR-Probe (PRsol) und die PR2D Probe gezeigt. Das PRsol Spektrum zeigt Banden bei (+)195 nm, (-)209 nm und (-)226 nm, diese Banden sind typisch für ein rein α -helikales Protein. PR2D weist demgegenüber einige Abweichungen auf. Es gibt zwar ebenfalls eine positive Bande bei 197 nm und zwei negative Banden bei 210 nm und 228 nm, allerdings ist die in PRsol vorhandene Symmetrie durch eine darunter liegende Bande

verzerrt. Neben der α -Helix muss es noch ein weiteres Strukturelement geben. Da die PR2D Proben eine Suspension der Kristalle in der Pufferlösung sind, streuen sie das Meßlicht deutlich stärker als die in Detergens solubilisierten Proben. Damit kann nur bis etwa 190 nm gemessen werden, bevor das Rauschen zu groß wird. Damit sind allerdings gängige Analyseverfahren zur Sekundärstrukturanalyse hinfällig. Um mit Hilfe von Datenbanken den prozentualen Anteil an α -Helix, ungeordneter Struktur, β -Faltblatt und Loop-Regionen verlässlich zu bestimmen, müssen die Daten zumindest bis 185 oder idealerweise noch weiter in den UV Bereich hinein aufgenommen werden. Zudem befinden sich in den Datenbanken nur Referenzspektren von solubilisierten Proteinen, die den Besonderheiten der 2D-Kristalle nicht repräsentieren können. Damit wird eine Sekundärstrukturanalyse durch einen Vergleich der PR2D Proben mit den Datenbanken nahezu unmöglich.[81]

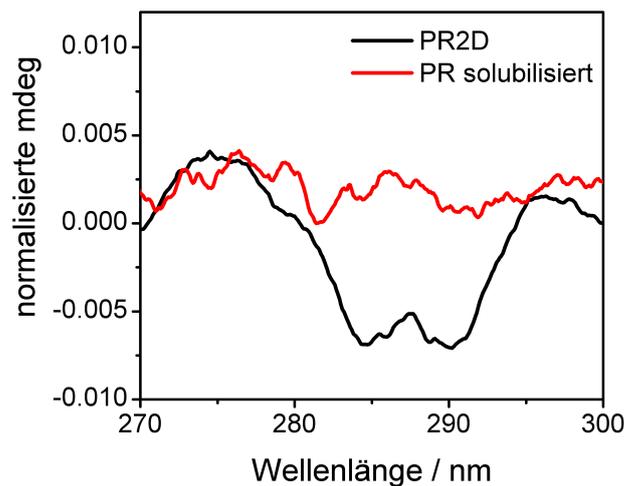


Abb. 5.4: Der vergrößerte Ausschnitt eines PR2D und PRsol CD-Spektrums zeigt ein kleine negative Doppelbande im Bereich der Absorption aromatischer Aminosäuren für die Kristalle (schwarze Kurve).

Die unterliegende Absorption im Bereich von ca. 220 bis 240 nm kann somit nicht eindeutig einem Strukturelement zugeordnet werden. Da es aber eine Besonderheit der PR2D Kristalle ist, liegt der Schluß nahe, dass es sich um Protein-Protein-Wechselwirkungen in dem zweidimensionalen Proteinkristall handelt. Ein genauerer Blick auf die Grenzregionen der CD-Spektren zeigt eine weitere Besonderheit der PR2D Proben. Neben den Unterschieden in der Sekundärstruktur sind im Bereich der Absorption aromatischer Aminosäuren kleine negative Signale in den PR2D Proben zu erkennen. In Abbildung 5.4 sind die Banden bei (-)284 nm und (-)290 nm gut

zu erkennen, auch wenn ihre Intensität sehr klein ist. CD-Signale in diesem Bereich stammen bei einem Protein von Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin oder Cystein.[82] Das Doppelsignal in diesem Bereich lässt sich somit auf die Wechselwirkung aromatischer Aminosäuren in den Kristallen zurück führen. In dieser Probenform gibt es folglich direkte Kontakte zwischen benachbarten Proteinen. Allerdings lässt sich Anhand der CD-Spektren keine Aussage zu der Form dieser Wechselwirkungen machen.

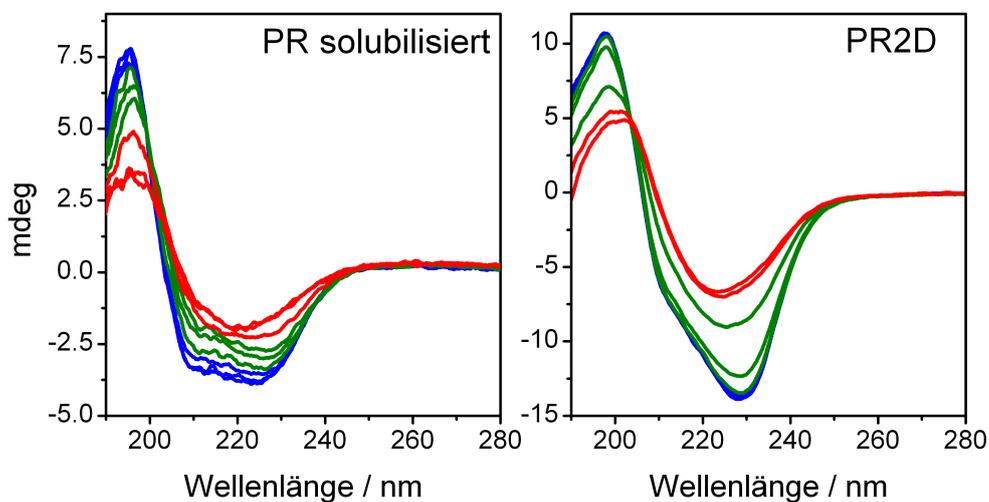


Abb. 5.5: In der Abbildung sind die temperaturabhängigen CD-Spektren zwischen 20 und 95 °C gezeigt (20-40 °C blau, 50-70 °C grün und 80-95 °C rot).

Die strukturellen Unterschiede der beiden Proben machen es notwendig, sich genauer mit der Stabilität der Proben auseinander zu setzen. Zu diesem Zweck wurden temperaturabhängige CD-Spektren zwischen 20 °C und 95 °C aufgenommen und für die beiden Proben verglichen. In Abbildung 5.5 sind die beiden Messungen gegenübergestellt. Bei Raumtemperatur ergibt sich das erwartete Bandenmuster für das α -helikale Protein mit den bereits erwähnten Abweichungen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen für die 2D-Kristalle.

Mit steigender Temperatur verliert die solubilisierte Probe schnell an Struktur und die α -Helixbanden verschwinden. Zurück bleibt die Absorption der ungeordneten Proteinstruktur um 220 nm. Bei den 2D-Kristallen bietet sich ein etwas anderes Bild.

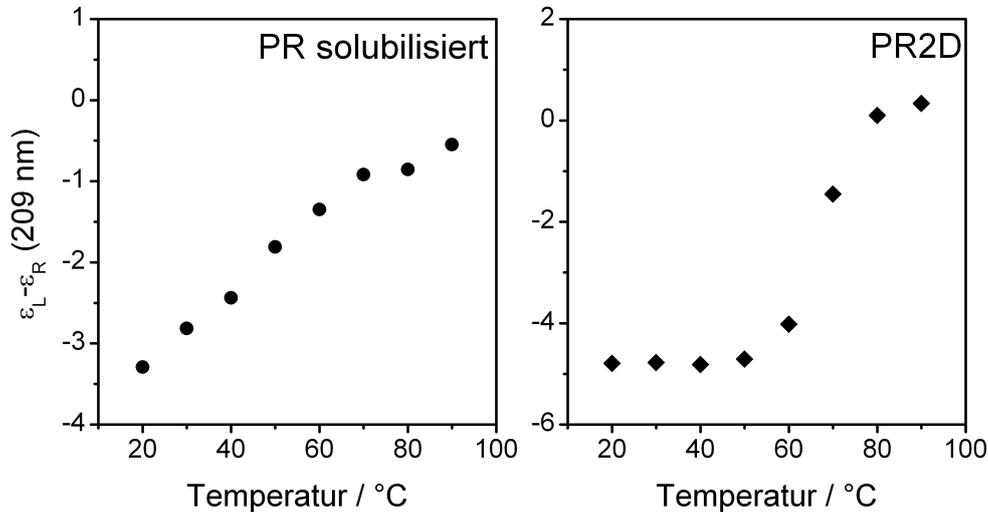


Abb. 5.6: Der Temperaturverlauf für PR2D und PRsol bei 209 nm wurden gegen die Temperatur aufgetragen um eine Aussage über die Stabilität der Proben machen zu können. Das Verschwinden der Bande geht auf die Hitzedenaturierung der Probe zurück.

Bis ca. 50 °C bleibt die Probe stabil und beginnt erst danach schnell ihre Struktur zu verlieren.

Der Temperaturverlauf für die Absorption bei 209 nm (entsprechend der Signale der α -Helix) ist in Abbildung 5.6 im Detail gezeigt. Die Darstellung macht deutlich, dass die Kristalle einer langsamen kontinuierlichen Denaturierung unterliegen, während die 2D Kristalle über einen weiten Temperaturbereich stabil bleiben. Die Übergangstemperatur liegt bei ca. 66 °C ist allerdings nur bedingt aussagekräftig, da der Prozeß irreversibel ist. Da die beiden Messungen allerdings unter den gleichen Bedingungen mit einem identischen Temperaturgradienten gemessen wurden, bleibt die Tatsache bestehen, dass die Kristalle ungleich stabiler sind als eine analoge solubilisierte Probe.

Inwieweit die Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäuren an der Aussenseite eines PR-Monomers daran beteiligt sind, lässt sich allerdings ohne geeignete Mutanten nicht klären. Im Homologiemodell sind allerdings einige außen liegende aromatische Seitenketten zu erkennen, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln könnten. Wie man in der Abbildung 5.7 erkennen kann, sind zu viele aromatische Aminosäuren in der PR Struktur vorhanden, um tatsächlich sinnvolle Voraussagen über die Herkunft des CD-Signals machen zu können. Sollte tatsächlich ein

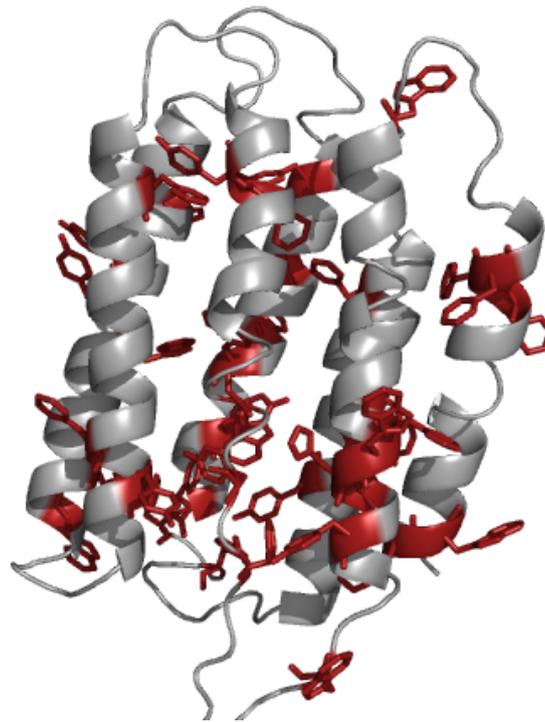


Abb. 5.7: Homologiemodell von PR mit hervorgehobenen aromatischen Aminosäuren. Die rot eingefärbten Seitenketten entsprechen Phe, Trp, Tyr und His

π -Stacking die Anordnung der Proteine in en Kristallen beeinflussen, so könnte man darüber eine Einblick in die Orientierung der Monomere bekommen.

5.1.1.3 Der Photozyklus für PR2D Kristalle

Die vorangegangenen Studien der Struktur von PRsol und PR2D haben einige signifikante Unterschiede in den beiden Probenpreparationen aufgezeigt. Die 2D Kristalle haben sich als deutlich stabiler erwiesen, sind aber in ihrer Sekundärstruktur durch Protein-Protein-Wechselwirkungen gekennzeichnet. Aus Studien an Rhodopsin 2D Kristallen ist bekannt, dass die starre Umgebung dieser Probenform die Proteinbewegung einschränken und damit die Funktionalität der Proben verhindern kann.[88] Daher ist es notwendig, den Photozyklus der PR2D Kristalle zu charakterisieren, bevor man die Proben für detailliertere Studien verwendet.

Der erste Schritt im PR Photozyklus nach der Anregung ist eine kombinierte Schwingung der konjugierten Doppelbindungen des Retinals in der Ebene, gefolgt von der Bindungsisomerisierung. Zusätzlich gibt es eine Bewegung auf der Torsionskoordinate, die zurück in den Grundzustand führt.[58] Allerdings liegen diese Bewegungen

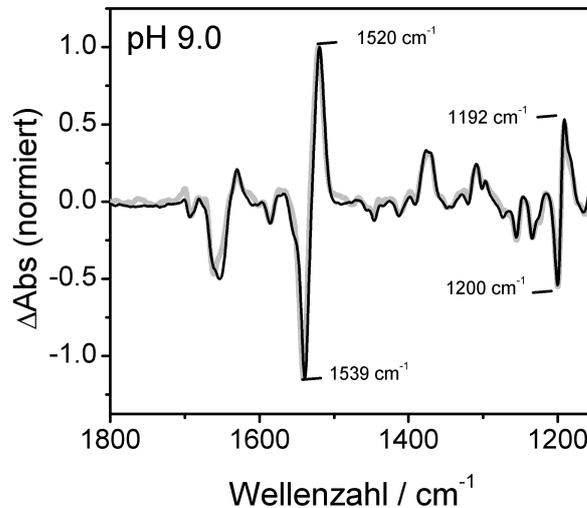


Abb. 5.8: Die Kurve zeigt ein hell-minus-dunkel Differenzspektrum für einen PR2D Film bei 77 K und pH 9. Die wichtigsten Differenzbanden sind die Retinal C-C Banden bei (+)1189 cm^{-1} , (-)1230 cm^{-1} und (-)1250 cm^{-1} und die C=C Banden bei 1520 und 1539 cm^{-1} .

im Bereich von Femtosekunden und sind mit klassischen FTIR Methoden nicht auflösbar. Dennoch ist dieser erste Schritt im PR Photozyklus mit Femtosekundenspektroskopie erfolgreich beobachtet worden.[89] Tieftemperatur- und zeitaufgelöste-IR-Techniken setzen erst mit der Beobachtung des K Intermediates und somit der vollständigen *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung des Retinals ein. Freies Retinal kann durch die Absorption von Licht eine Vielzahl an Isomeren ausbilden. Das kovalent über eine Schiff'sche Base an das Protein gebundene Retinal in PR wird durch Licht mit einer Wellenlänge um 520 nm zu einer *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung gezwungen. Das in Abbildung 5.8 gezeigte Differenzspektrum zeigt die Isomerisierung des Retinals in PR2D Filmen bei alkalischem pH. Das Spektrum wurde bei 77 K gemessen, nachdem der Proteinfilm für 60 s belichtet wurde. Als Hintergrund wurde das Spektrum der unbelichteten Probe verwendet. Das dadurch erhaltene Differenzspektrum zeigt nur die Beiträge der an der Isomerisierung beteiligten Bindungen. Die intensive Bande bei (-)1540/(+)1520 cm^{-1} im Amid II Bereich des Spektrums entspricht einer C=C Streckschwingung des Chromophors für PR_K -PR.[90]

Die Banden bei (-)1255 cm^{-1} , (-)1232 cm^{-1} , (-)1198 cm^{-1} und (+)1192 cm^{-1} entsprechen dem typischen Muster für die Änderungen in den C-C Streckschwingungen des Retinals für eine *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung. Die Anwesenheit dieser Banden bestätigt ganz klar die korrekte Isomerisierung des Chromophors in den 2D-Kristallen.

Die negativen Banden stammen vom *all-trans* Isomer, während die positiven Banden dem *13-cis* Isomer entsprechen. Zwischen 1300 und 1400 cm^{-1} gibt es insgesamt 4 positive Banden die den C-H und N-H Streckschwingungen für in der Chromophor-Ebene liegende Bindungen entsprechen. Die C=N Bande der Schiffsbasis erzeugt eine Differenzbande bei $(+1631/(-)1650\text{ cm}^{-1})$. Allerdings ist die negative Bande bei 1650 cm^{-1} verbreitert und enthält wahrscheinlich zusätzlich einen Amid I Beitrag. Diese Zuordnung entspricht Beobachtungen aus [58]. Das Spektrum enthält allerdings nur kleine Beiträge des Proteinrückgrats (Amid I/II) und Veränderung im Protonierungsgrad von Asp oder Glu Seitenketten sind nicht erkennbar. Bei 77 K und $\text{pH } 9,0$ liegt somit ausschließlich ein K-Intermediat vor.

Obwohl die Isomerisierung des Retinals ein sehr schneller Prozess ist, können spätere Intermediate des Photozyklus mit zeitaufgelöster IR-Spektroskopie untersucht werden. Daher wurden für die PR2D-Kristalle Rapid Scan Spektren bei Raumtemperatur aufgenommen (vgl. Abbildung 5.9). Dabei wurden ausschließlich Proteinfilmchen mit einem pH -Wert von $9,0$ verwendet, da aus der Literatur bekannt ist, dass der kinetische Photozyklus bei saurem pH und Raumtemperatur nur einen Teil der bei $\text{pH } 9,0$ beobachteten Intermediate enthält. Die Messungen erlauben die Aufnahme von Differenzspektren ($PR_{532nm} - PR_{dunkel}$) im Abstand von 10 ms .

Da sich im PR-Photozyklus die verschiedenen Intermediate stets in einem Gleichgewicht zueinander befinden, können keine reinen Intermediat-Spektren gezeigt werden. Allerdings sind in Abbildung 5.9 drei transiente Differenzspektren bei verschiedenen Zeiten gezeigt, die jeweils charakteristische Beiträge für verschiedene Intermediate enthalten. Die Spektren zeigen die Differenzbanden nach 75 ms (schwarz), von 75 bis 225 ms und von 225 bis 450 ms .

Im ersten Spektrum nach 75 s sind die bereits im 77 K Spektrum sichtbaren Banden für die *all-trans* nach *13-cis* Isomerisierung des Retinals immer noch teilweise in der 1180 - 1280 cm^{-1} Region sichtbar, aber die Bande der C=C Streckschwingung bei $(+)1520\text{ cm}^{-1}$ ist bereits verschwunden. Weitere markante Banden sind in der Amide I und II Region bei $(+)1660\text{ cm}^{-1}$ und $(+)1552\text{ cm}^{-1}$ und in der Asp/Glu-Seitenketten Region bei $(+)1755\text{ cm}^{-1}$ zu finden. Die Bande bei 1755 cm^{-1} ist charakteristisch für das M-Intermediat und ist auf eine Protonierung des Protonenakzeptors Asp-97 zurück zu führen. Einhergehend mit der Protonierung Asp-97 und damit der Deprotonierung des Retinals findet eine Strukturänderung im Protein statt. Diese ist gut an den Differenzbanden in der Amid I- und II-Region zu erkennen. Die Bewegung in den Transmembranhelices ist notwendig, um eine Öffnung des Proteins zur extrazel-

lulären Seite der Membran zu ermöglichen, so dass das Proton in die extrazelluläre Matrix abgegeben werden kann.

Die blaue Kurve zeigt zum einen ähnliche Banden, wie das vorhergehende Spektrum. Einflüsse des M-Intermediats sind deutlich sichtbar. Allerdings weisen die Banden

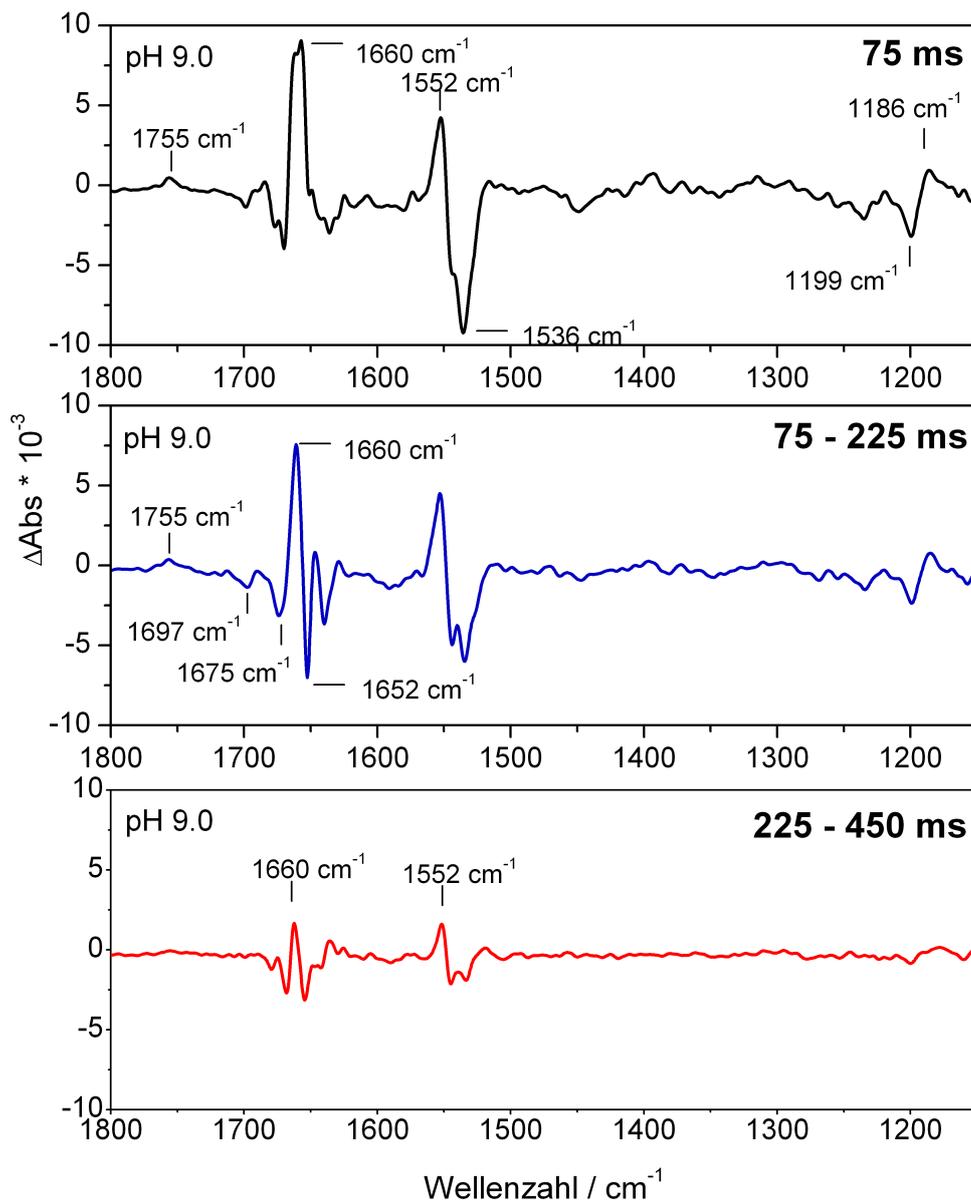


Abb. 5.9: Die Kurve zeigt hell-minus-dunkel Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten nach der Anregung für einen PR2D Film bei RT und pH 9,0.

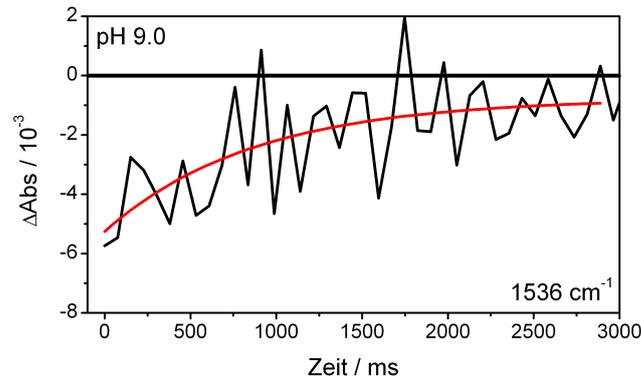


Abb. 5.10: Die Kurve zeigt die zeitliche Absorptionsänderung für die Rückisomerisierung des Retinals in den Grundzustand.

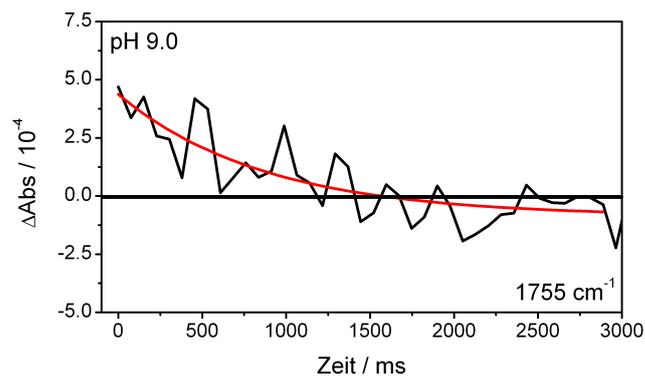


Abb. 5.11: Die Kurve zeigt die Referenzbande für das M-Intermediat über die Zeit

in der Amid I Region deutliche Unterschiede auf. Die hier ausgeprägtere Kombination aus einer positiven 1660 cm^{-1} Bande und den zwei negativen Banden bei 1697 cm^{-1} und 1675 cm^{-1} ist laut Friedrich *et al.* ein Indikator für das N-Intermediat im PR Photozyklus. Auch kleine positive Signale im Bereich 1300 bis 1400 cm^{-1} sind vorhanden.[22, 27]

Im letzten Spektrum nach beinahe einer halben Sekunde bleiben nur noch die intensivsten Differenzbanden sichtbar. Wie erwartet ist in keinem der drei Spektren ein reines Intermediat beobachtbar. Zu Beginn findet man Anteile des K Intermediates und ein stark ausgeprägtes M-Intermediat mit den ersten Hinweisen auf ein N-Intermediat. Danach folgt ein M/N Gleichgewicht und eine Mischung aus den späten Intermediaten. Um die Frage zur Reversibilität des Photozyklus bei 2D-Kristallen

abschließend zu beantworten, wird auch die transiente Absorptionsänderung bei (-)1536 cm^{-1} und (+)1755 cm^{-1} genauer betrachtet. Die Kinetik für die Protonierung von Asp-97 zeigt anschaulich, dass bereits im ersten Spektrum nach der Belichtung das M-Intermediat präsent ist. Durch die geringe Intensität des Signals, es resultiert aus einer einzelnen OH-Bindung in einem 27 kD Protein, ist es nicht möglich eine aussagekräftige exponentielle Funktion an die Daten anzupassen ($\tau_1 = 990 \text{ ms} \pm 280 \text{ ms}$). Die Kinetik für die Rückkehr des Retinals zum *all-trans* Isomer lässt sich allerdings mit einer monoexponentiellen Funktion anpassen. Die Reisoomerisierung benötigt etwa $\tau_2 = 600 \text{ ms}$. Das Signal ist allerdings mit einem großen Rauschen unterlegt. Dies ist verständlich, wenn man sich vor Augen führt, dass das Absorptionsspektrum des Proteinfilms eine große Amid II Bande (ca. 0.4 OD) aufweist, die die Änderung in der Größenordnung $6 * 10^{-3}$ OD überlagert. Durch die Differenztechnik wird das Signal jedoch sichtbar.

Aus den Kinetiken kann man ableiten, dass die 2D-Kristalle einen vollständigen Photozyklus durchlaufen und wieder in den Anfangszustand zurückkehren, allerdings ist die Reisoomerisierung deutlich schneller, als vergleichbare Kinetiken von PR in Membranfragmenten.[28] Das ist insofern einleuchtend, als dass die starre Kristallumgebung die ersten Schritte des Photozyklus behindert und verlangsamt, aber im Gegenzug die Reisoomerisierung fördert. Ein weiterer Hinweis für die Funktionstüchtigkeit der Kristalle ist sicher auch die Wiederholbarkeit des Experiments mit ein und demselben Proteinfilm. Es findet kein Ausbleichen statt und die Differenzbanden werden im Laufe der Zeit nicht kleiner. Eine Abnahme der Signalintensität würde auf eine langsame Zerstörung der Probe hindeuten, die entweder durch die Energie des Lasers ausgelöst wird, oder durch einen unvollständigen Photozyklus. Da die Rapid-Scan Messungen mit verschiedenen Pulsenergien des Lasers durchgeführt wurden, um zu gewährleisten, dass die Probe möglichst vollständig angeregt wird ohne ein Photobleichen des Films zu riskieren, sollte ein Signalverlust nur durch in einem Zwischenschritt des Photozyklus gefangene Proteine ausgelöst werden.

5.1.2 Tieftemperatur FTIR Daten

Die bereits vorhandenen Erkenntnisse über den PR Photozyklus aus der Schwingungsspektroskopie beziehen sich im allgemeinen auf kinetische Studien bei Raumtemperatur und einige Messungen bei 77 K um die Isomerisierung des Chromophors zu beobachten. Aus den kinetischen Messungen geht hervor, dass ein vollständiger

Photozyklus nur im alkalischen existiert, während im sauren pH-Bereich entscheidende Intermediate fehlen. Diese Erkenntnisse sind allerdings nicht mit allen elektrophysiologischen Messungen vereinbar und widersprechen einer Tieftemperaturstudie zwischen 150 und 240 K im sichtbaren Spektralbereich, in der ein M-Intermediat spektroskopisch nachgewiesen wurde.

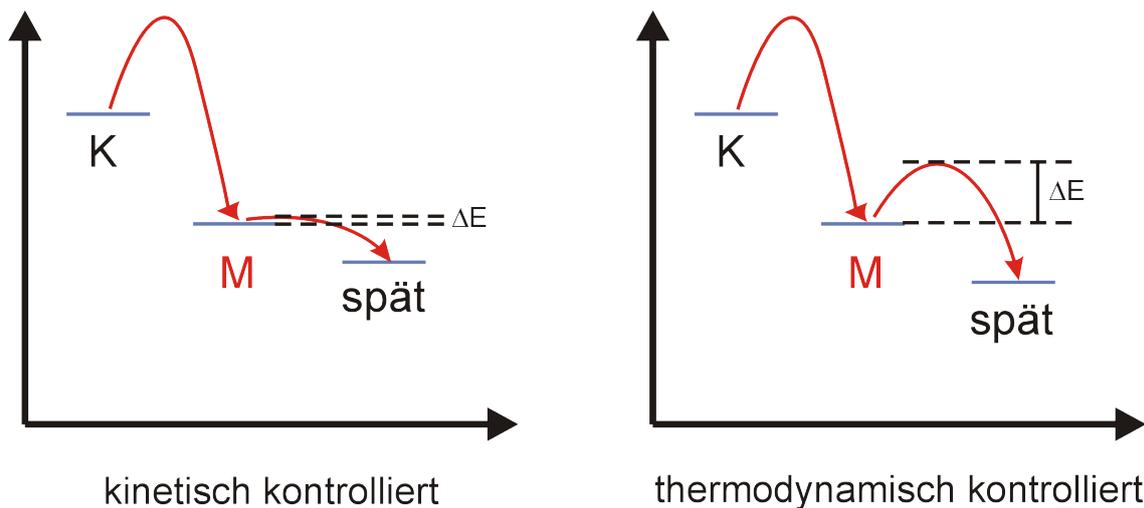


Abb. 5.12: Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Schema der kinetisch und thermodynamisch kontrollierten Abfolge der Intermediate im PR Photozyklus

Die temperaturabhängigen VIS-Spektren zeigen bei pH 4.0 eine Bande bei etwa 425 nm. Diese Bande entspricht der deprotonierten Schiff'schen Base im M-Intermediat. Es ist daher wahrscheinlich, dass PR bei tiefen Temperaturen einen veränderten Photozyklus zeigt. Während bei der kinetisch kontrollierten Messung bei Raumtemperatur das M-Intermediat bei saurem pH auf Grund einer geringen Aktivierungsenergie sehr schnell in die späten Intermediate übergeht und daher nicht akkumuliert, wird es bei einer thermodynamisch kontrollierten Messung bei niedrigen Temperaturen sichtbar. Es ist auch insofern verständlich, dass das M-Intermediat besonders durch das Einfrieren der Probe beeinflusst wird, da es sich um den Schritt im Photozyklus handelt, in dem eine größere Helixbewegung erforderlich ist. Diese wird bei tiefen Temperaturen besonders stark eingeschränkt.

In den folgenden Abschnitten werden daher ausschließlich Tieftemperaturspektren zwischen 77 und 257 K gezeigt, in denen der Photozyklus für vier verschiedenen pH-Werte (5,1 / 5,5 / 8,5 und 9,0) untersucht wird. Gerade für die sauren pH-Werte ergibt sich dabei die Frage nach einem schwingungsspektroskopisch identifizierbaren M-Intermediat.

5.1.2.1 K Intermediate für PR2D und PRrek

Die Tieftemperaturspektren bei 77 K geben einen Einblick in die Isomerisierung des Chromophors und werden dominiert von den C-C, C=C und C=N Schwingungen des Retinals. In Abbildung 5.13 sind die IR-Differenzspektren für PR_K-PR bei zwei pH-Werten gezeigt, die deutlich ober- und unterhalb des pK_a-Werts des Protonenakzeptors Asp97 liegen. Das pH 9,0 Spektrum wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt zur Funktion der PR2D-Kristalle detailliert besprochen und zeigt wie erwartet das Bandenmuster für die *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung. Das Spektrum ist für beide Probenformen (2D-Kristalle und rekonstituiertes Protein) identisch. Die absolute Signalintensität ist für saure pH-Werte geringer und die Signale sind daher etwas stärker verrauscht. Es ist allerdings wieder offensichtlich, dass PRrek und PR2D im Rahmen der Messgenauigkeit identische Signale zeigen.

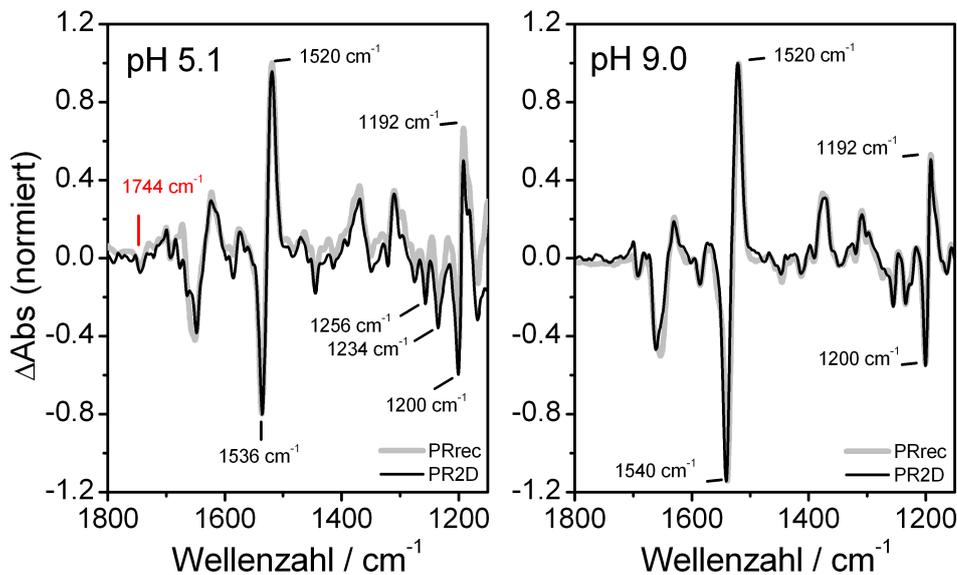


Abb. 5.13: Differenzspektrum PR_{K/L}-PR für pH 5,1 und PR_K-PR pH 9,0 bei 77 K für rekonstituierte Proben und die 2D-Kristalle. Die Differenzbanden zeigen die *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung des Retinals. Bei pH 5,1 ist zusätzlich ein negatives Signal bei 1744 cm⁻¹ zu erkennen

Bei pH 5,1 sind wieder die CN Streckschwingung bei (-)1651 cm⁻¹, die C=C Banden bei (+)1520 und (-)1536 cm⁻¹ und die C-C Streckschwingungen bei (+)1191, (-)1200, (-)1234 und (-)1256 cm⁻¹ zu beobachten. Im Bereich von 1280 bis 1400 cm⁻¹

finden sich die N-H und C-H Beiträge. Eine Änderung des pH-Werts sorgt für kleine Verschiebungen in den Bandenpositionen des Retinals. Die Differenzbande bei (-)1693 und (+)1700 cm^{-1} ist allerdings unabhängig vom pH-Wert der Umgebung. Durch Experimente mit Mutanten konnte diese Bande Asn-230 zugeordnet und ein Einfluss von Asp-97 oder Asp-227 ausgeschlossen werden.[90, 91] Im Unterschied zu den pH 9,0 PR_K-PR Spektren gibt es allerdings eine negative Bande im Bereich der C=O Streckschwingung der Carboxylgruppen von Glu und Asp bei 1744 cm^{-1} . Bisher konnte dieses Signal in bereits veröffentlichten Tieftemperatur Spektren nicht identifiziert werden. Allerdings existieren Step-Scan Messungen von PR_{rek} mit Di-Myristoylphosphatidylcholine als Lipid, in denen ebenfalls dieses Signal beobachtet wurde.[92] Xiao et. al. interpretieren das Signal in Analogie mit BR als eine Störung oder Deprotonierung von Glu-108, dem Homolog zu Asp-96 in BR.[93, 94] Im allgemeinen wird dieser Beitrag als Indiz für die Existenz eine L-Intermediats gewertet und dient als dessen Markerbande. Das Auftauchen der Glu-108 Störung ist, wie in den K/L-Spektren gut zu erkennen ist, stark pH-abhängig. Während bei alkalischem pH bei der niedrigsten messbaren Temperatur in unserem Aufbau ein reines K-Intermediat beobachtet werden kann, ist der Photozyklus bei pH 5,1 und 77 K bereits weiter fortgeschritten.

Die für PR so bestimmende pH-Sensibilität ist auch der Grund, einen genaueren Blick auf Veränderungen in den K Spektren ausgelöst durch kleine pH-Änderungen zu werfen. In Abbildung 5.14 sind die K-Spektren für pH 5,1 und 5,5 für PR_{rek} und PR2D gegenübergestellt. Auf den ersten Blick finden sich in den Differenzspektren die selben Banden und es gibt erneut keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Probenpräparationen. Im Bereich von 1500 bis 1600 cm^{-1} ist allerdings im schraffierten Bereich des bei pH 5,5 aufgenommenen Spektrums eine zusätzliche Bande zu erkennen. Die positive Bande bei 1546 cm^{-1} ist allerdings von der C=C Schwingung des Retinals überlagert. Zusammen mit einem schwer aufzulösenden Beitrag im Amid I Bereich lässt diese Bande darauf schließen, dass bereits eine erste Umorientierung stattfindet, getrieben von der Isomerisierung des Retinals. Damit ist klar dass die Änderung des pHs um eine halbe Einheit den Photozyklus des Proteins nicht unbeeinflusst lässt.

Inwieweit diese Beobachtung auf die Messungen im alkalischen pH-Bereich zutreffen, ist in Abbildung 5.15 gezeigt. Die Spektren des K-Intermediates bei pH 9,0 sind wieder zum Vergleich den Spektren bei pH 8,5 gegenübergestellt. Die Differenzbanden sind erneut nahezu identisch. Für pH 8,5 beobachtet man die charakteristischen Banden des Retinals bei (-)1200 und (+)1192 cm^{-1} , (-)1540 und

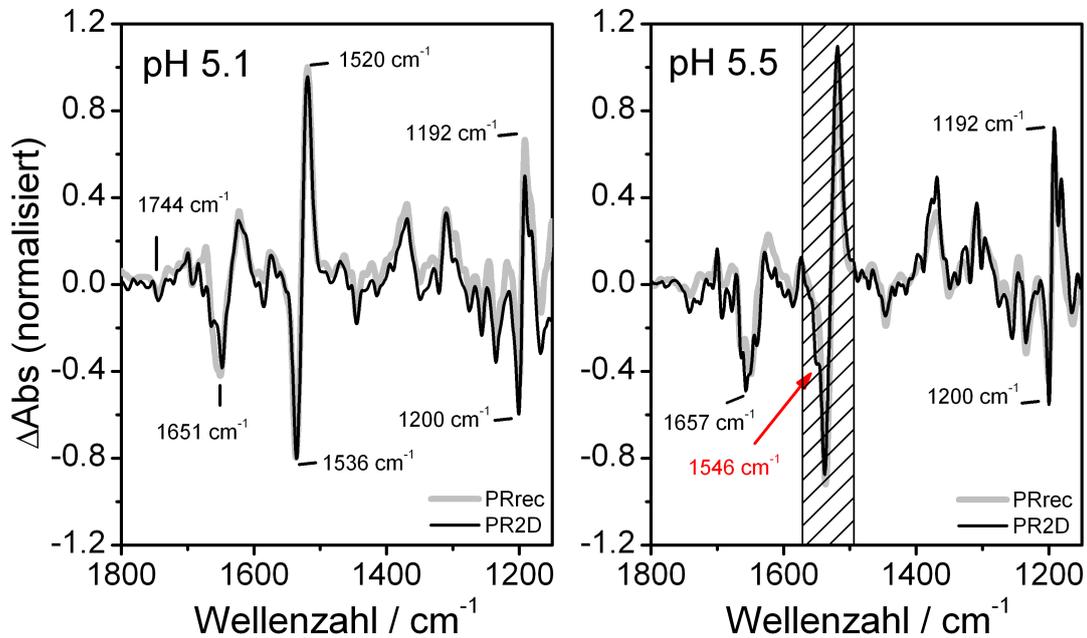


Abb. 5.14: Differenzspektrum PR_K -PR für pH 5,1 und pH 5,5 bei 77 K. Die Differenzbanden zeigen die *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung des Retinals.

(+) 1520 cm^{-1} und die in der Ebene liegenden NH/CH Schwingungen zwischen 1280 und 1400 cm^{-1} . Soweit sind die Spektren für die beiden verglichenen pH-Werte erneut identisch, allerdings findet sich wieder ein zusätzlicher Amid Beitrag in der Amid I Region mit einer überlagerten positiven Bande bei 1546 cm^{-1} . Damit sorgt auch die Absenkung des pH-Werts von 9,0 auf 8,5 für eine Änderung der Energiebarrieren für den Übergang zwischen den verschiedenen Intermediaten. Da bei kleinen pH-Unterschieden stets die Frage aufkommt, in wie weit der pH-Wert in einem Proteinfilm exakt bestimmt werden kann, wurden die Messungen zum einen mehrfach wiederholt. Dabei fand sich jedesmal ein signifikanter Unterschied in Proben mit einer halben pH-Einheit Unterschied. Außerdem wurde durch hohe Pufferkonzentrationen und eine Kontrolle des Absorptionsmaximums der pH-Wert best möglich eingestellt. Unabstreitbar und unabhängig von der exakten pH-Differenz bleibt die Erkenntnis, dass ein Absenken (Erhöhen) des pH-Werts von pH-Werten, die deutlich über (unter) dem pK_a -Wert von Asp-97 liegen, zu Änderungen in den Energiebarrieren für den Übergang zwischen den Intermediaten führt.

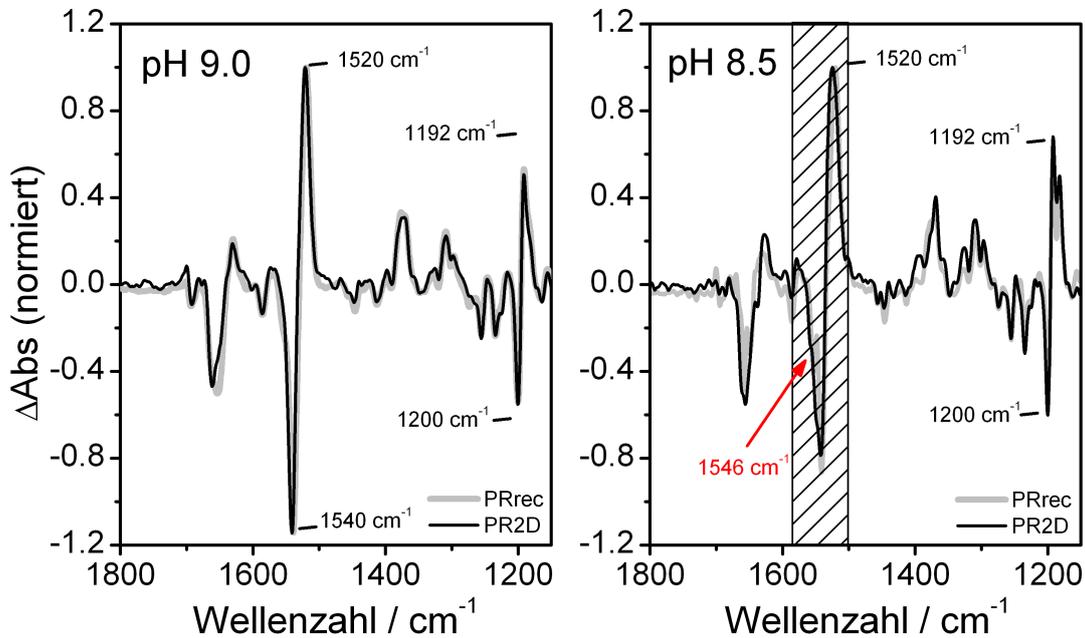


Abb. 5.15: Differenzspektrum PR_K -PR für pH 9,0 und pH 8,5 bei 77 K. Die Differenzbanden zeigen die *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung des Retinals. Zusätzlich zeigt das pH 8,5 Spektrum einen Beitrag im Amid II-Bereich bei 1546 cm^{-1} (schraffierter Bereich).

5.1.2.2 Photozyklus bei pH 9,0

Der Photozyklus bei alkalischen pH-Werten ist mit zeitaufgelöster Spektroskopie, sowohl in dieser Arbeit als auch an anderer Stellen in der Literatur, untersucht worden. Auch wenn die Beteiligung bestimmter Aminosäuren, der Einfluss von Mutanten auf die verschiedenen Intermediate und die generell präparationsabhängige Kinetik einzelner Teilschritte des Photozyklus noch Raum für Untersuchungen und Diskussion lassen, so ist der grundsätzliche Ablauf doch klar. Bevor somit die komplexe Frage nach dem Photozyklus bei pH 5,1 und die Existenz eines M-Intermediats diskutiert werden soll, ist es notwendig, den Einfluss der Tieftemperaturmethodik auf den kompletten Photozyklus zu untersuchen. Bisher wurde in der Literatur nahezu ausschließlich das K-Intermediat bei 77 K untersucht. Vor allem die Gleichgewichte zwischen den nachfolgenden Intermediaten von M bis O machen es unmöglich, eine Temperatur zu finden, bei der der Photozyklus in genau einem Intermediat gestoppt

wird. Die Temperatur wurde zwischen 77 und 260 K variiert, um einzelne Intermediate zu finden. Bis nahe an die 200 K Grenze wurde bei pH 9,0 ausschließlich das K-Intermediat gefunden, danach weisen die Differenzspektren Banden verschiedener Intermediate auf. Um der Umwandlung der Intermediate und dem damit sehr langsam ablaufenden Photozyklus Rechnung zu tragen, wurden zeitaufgelöste Spektren bei genau definierten Temperaturen aufgenommen.

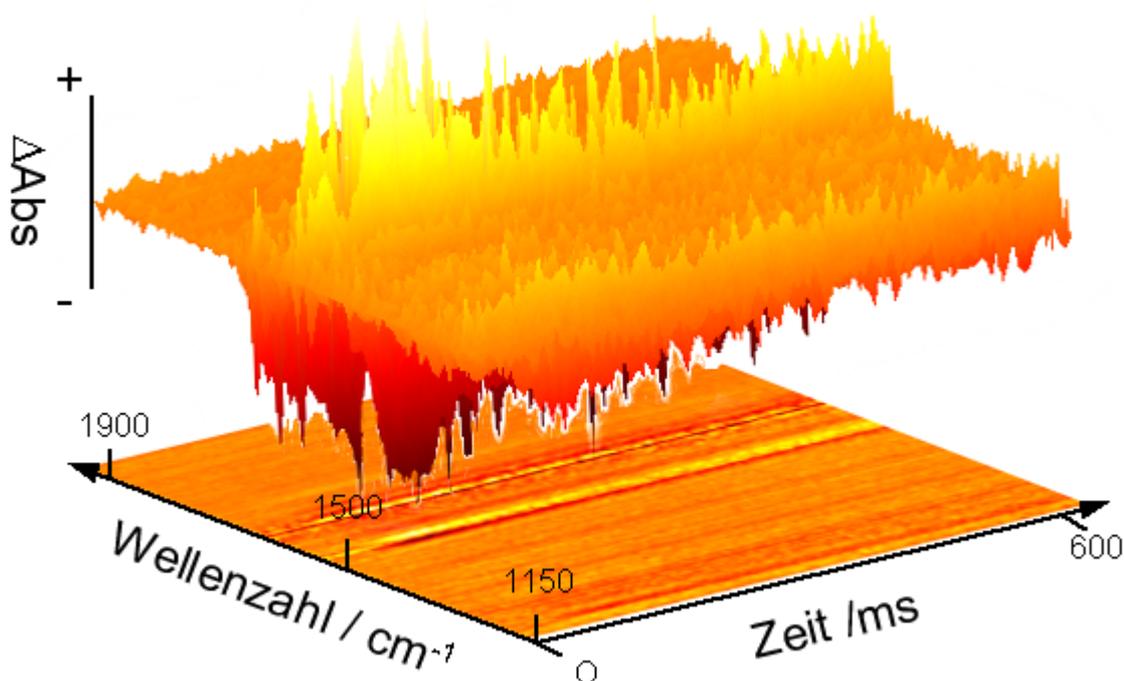


Abb. 5.16: Zeitaufgelöstes Spektrum einer PR2D Probe bei pH 9,0 und 257 K. Die 3D Darstellung und die Projektion auf die XY-Ebene zeigen das Entstehen eines M-Intermediats nachdem nach ca. 50 ms mit der Belichtung der Probe begonnen wurde.

Es wurde ein Hintergrundspektrum des Proteinfilms ohne Anregung gemessen und danach der Photozyklus angeregt. Aus den zeitabhängig aufgenommenen Differenzspektren können sowohl einzelne Spektren als auch die Kinetik bei einer einzelnen Wellenlänge extrahiert werden. In Abbildung 5.16 ist ein solches dreidimensionales Spektrum zu sehen, allerdings ist die Darstellung nicht dazu geeignet, kleine Details in den Differenzbanden anschaulich zu präsentieren. Daher werden im weiteren Verlauf ausschließlich die extrahierten Differenzspektren und Kinetiken näher erläutert.

In Abbildung 5.17 ist ein Differenzspektrum für PR bei pH 9,0 und 257 K 77 s nach Beginn der Belichtung gezeigt. Im Amid II Bereich findet man zwei ausgeprägte Banden bei (-)1536 und (+)1554 cm^{-1} und in der Amid I Region sind bei (-)1650, 1675 und 1697 cm^{-1} und bei (+)1660 cm^{-1} Banden zu erkennen. Zusätzlich ist bei (+)1755 cm^{-1}

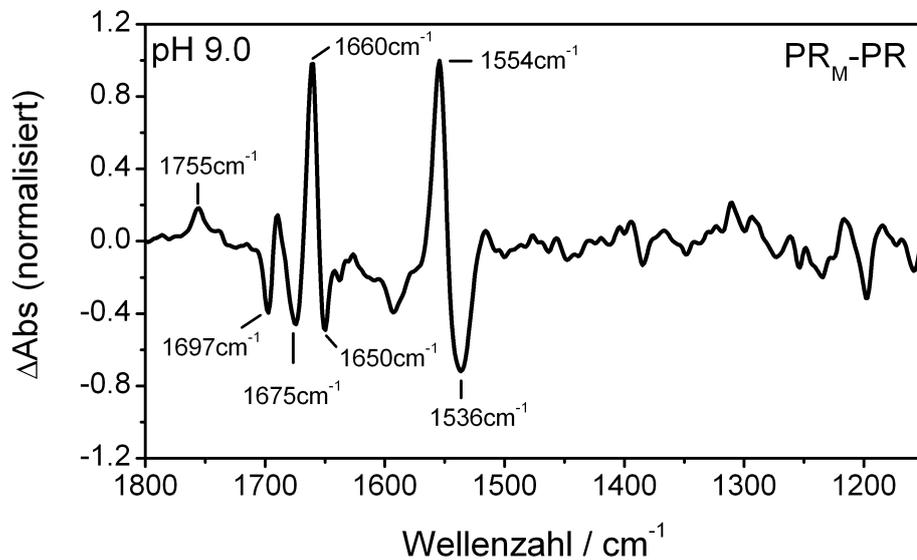


Abb. 5.17: Differenzspektrum PR_M -PR bei pH 9,0. Auffällig sind die Bande des Protonenakzeptors Asp97 bei 1755 cm^{-1} und die Beiträge der Amide II-Bande. (Rapid-Scan Spektrum bei 257 K, transientes Spektrum nach 77 s)

ein Signal in der Asp/Glu Region zu beobachten. Diese Bande wird der Protonierung des Protonenakzeptors Asp-97 und damit dem M-Intermediat zugeordnet.[27, 22] Gleichzeitig mit der Protonierung von Asp-97 tauchen die markanten Banden bei 1554 und 1660 cm^{-1} auf. Diese beiden Banden lassen sich als Bewegung im Helixbündels des PRs deuten, da zum Zeitpunkt des Entstehens des M-Intermediats eine Öffnung des Proteins zur extrazellulären Seite notwendig ist, um ein Proton an die Umgebung abzugeben. Neben Asp-97 sind für die Freisetzung des Protons sicherlich noch weitere Gruppen notwendig, allerdings lassen sich diese spektroskopisch nicht fassen. Es können sowohl Wassercluster als auch Aminosäuren das Proton von Asp-97 übernehmen.

Mit den Amid Änderungen und dem Asp-97 Signal ist die Zuordnung der Hauptkomponenten des Septktrums zu einem PR_K -PR Spektrum eindeutig. Die negativen Banden bei 1675 und 1697 cm^{-1} sind allerdings nicht Teil des M-Intermediatspektrums, sondern stammen vom N-Intermediat.[22] Eine Absenkung der Temperatur führt allerdings nicht zu einer Isolierung des M-Intermediats sondern sorgt nur für die Beteiligung von Banden des K-Intermediats an dem Differenzspek-

trum. Verfolgt man die IR-Banden über einen sehr langen Zeitraum, so entwickelt sich der Photozyklus stets weiter.

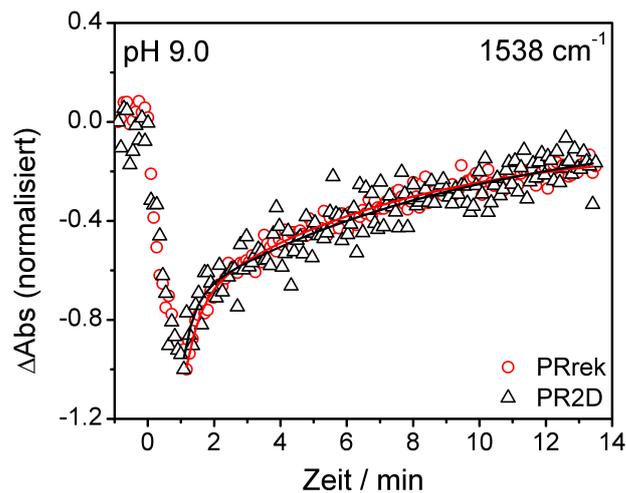


Abb. 5.18: Transienten bei 1538 cm^{-1} (C=C Streckschwingung des Retinals) aus Differenzspektren PR_M -PR bei pH 9,0 und 257 K. Die Transienten für beide Probenpreparationen PRrek und PR2D zeigen die Erholungszeit für das isomerisierte Retinal.

Die verschiedenen Probenpräparationen PR2D und PRrek haben in den bisherigen Messungen keinerlei Unterschiede in der Bandenposition und Funktionalität gezeigt. Allerdings ist bekannt, dass die Lipidkonzentration und der Wassergehalt von Proteinfilmen einen starken Einfluss auf die Kinetik des Photozyklus haben kann.[95, 96] Daher ist in Abbildung 5.18 die Reisomerisierungs-Kinetik für die C=C Streckschwingung des Chromophors dargestellt. Die Transienten bei 1538 cm^{-1} stammen aus zeitaufgelösten Messungen bei 257 K (pH 9,0). Vor dem Anpassen der Kinetik mit einer e-Funktion wurde eine Glättung mit einem 5-Punkt-Algorithmus durchgeführt. Da für die PR2D Messung Datenpunkte alle 10.3 s und für die PRrek Messung alle 5.3 s aufgenommen wurden, ist die Auflösung ausreichend groß, um die Glättung zu erlauben. Der erste Anstieg des negativen Signals stammt aus der Akkumulation von angeregtem Protein durch die sechzigsekündige Belichtung der Probe über den Lichtleiter. Nach Ausschalten der Lampe kommt kein neu isomerisiertes Retinal mehr hinzu und die Reisomerisierung dominiert die Kinetik. Die Zeitkonstanten für die Transienten liegen bei $<1\text{ min} / 7\text{ min}$ (PRrek) und $<1\text{ min} / 8\text{ min}$ (PR2D) und

sind damit im Rahmen der Fehlergrenzen identisch. Im alkalischen lässt sich somit kein Einfluss der Lipidkonzentration auf die Kinetik des Photozyklus beobachten.

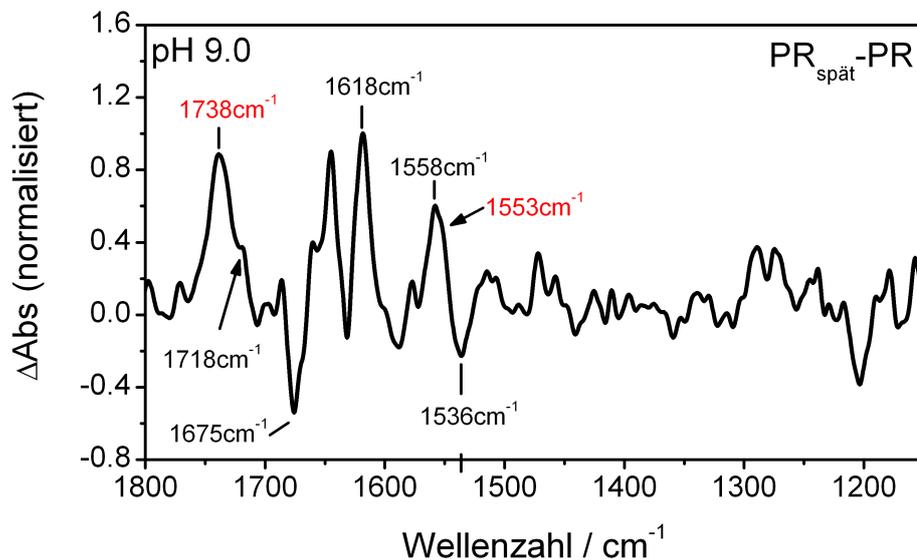


Abb. 5.19: Differenzspektrum $PR_{spät}$ -PR bei pH 9,0 (257 K nach 40 min). Das Spektrum zeigt ein Gleichgewicht aus mehreren späten Intermediaten des Photozyklus.

Wie bereits erwähnt, sind bei einer gegebenen Temperatur keine statischen Intermediatspektren zu erwarten. Der Photozyklus durchläuft stattdessen langsam sämtliche Intermediate. In Abbildung 5.19 ist das PR_{dunkel} - PR_{hell} Spektrum für pH 9,0 40 min nach der Belichtung gezeigt. Das Spektrum vereint die Beiträge der späten Intermediate (\equiv Intermediate nach M). Die wichtigsten Banden sind unter anderem zwei Signale in der Asp/Glu-Region bei (+)1718 und (+)1738 cm^{-1} . Die Bande bei 1738 cm^{-1} ist deutlich ausgeprägter und wurde in einer früheren Publikation bei kinetischen Messungen einer Störung der Umgebung von Glu-108 zugeordnet, die sich auch in den offensichtlichen Änderungen der Proteinumgebung im Amid I und II Bereich zeigt.[92] Allerdings könnte auch eine Verschiebung der Asp-97 Bande die Ursache für dieses Signal sein. Bei BR wurde eine solche Verschiebung für einen M/N Übergang beobachtet (1761 $cm^{-1} \rightarrow$ 1755 cm^{-1}) und wurde dabei gleichzeitig mit einer negativen Bande bei 1670 und zwei positiven Banden bei 1647 und 1610 cm^{-1} beobachtet.[97] Ein genauer Blick in die Amid I und II Regionen unseres Differenzspektrums zeigt Banden bei (-)1631 und 1675 cm^{-1} und bei (+)1618, 1645, 1553 und 1558 cm^{-1} zu erkennen. Die Amid I Signale passen sehr schön zu den Signalen des N-

Intermediats bei BR und lassen die Zuordnung der 1738 cm^{-1} Bande zu einer Störung des Protonenakzeptors wahrscheinlich werden.

Tab. 5.2: Charakteristische IR-Banden des PR Photozyklus bei pH 9,0

Intermediat	Bandenposition in H_2O (MIR) in cm^{-1}	Bandenzuordnung
K	1192, 1200, 1232, 1255 1520, 1540 1300-1400 (4 Banden) 1631, 1650 1650	Retinal (C-C) Retinal (C=C) Retinal (N-H/C-H in plane) Retinal (C=N) evtl. Amid I PR
M	1554, 1660 1755	Bewegung des Helixbündels Protonierung Asp-97
spät	1738 1718	Glu-108 Protonierung Asp/Glu

Allerdings gibt es mit der Bande bei 1718 cm^{-1} auch bereits Indizien für ein *o*-Intermediat. Im Gegensatz zu BR findet sich in den PR Spektren der späten Intermediate kein Anzeichen für die Deprotonierung einer Asp oder Glu Seitenkette. Die restlichen beobachteten Differenzbanden zeigen allerdings eine erstaunliche Ähnlichkeit zu den späten BR-Intermediaten. Dies ist nach den doch sehr unterschiedlichen Bandenpositionen für BR und PR K- und M-Differenzspektren nicht offensichtlich. Es bleibt dennoch die klare Erkenntnis aus den vorgestellten Spektren, dass bei pH 9,0 bei tiefen Temperaturen generell die Charakterisierung des vollständigen Photozyklus möglich ist.

5.1.2.3 Photozyklus bei pH 5,1

Nachdem fest steht, dass der Photozyklus von PR in seiner Gesamtheit mit Tieftemperatur IR-Spektroskopie beobachtet werden kann, auch wenn die Energiebarrieren und Kinetiken naturgemäß von denen bei Raumtemperatur abweichen, werden die Messungen auch für pH 5,1 durchgeführt. Die K-Spektren sind bereits ausführlich besprochen worden und werden in diesem Abschnitt daher nicht mehr aufgegriffen (vgl. 5.1.2.1).

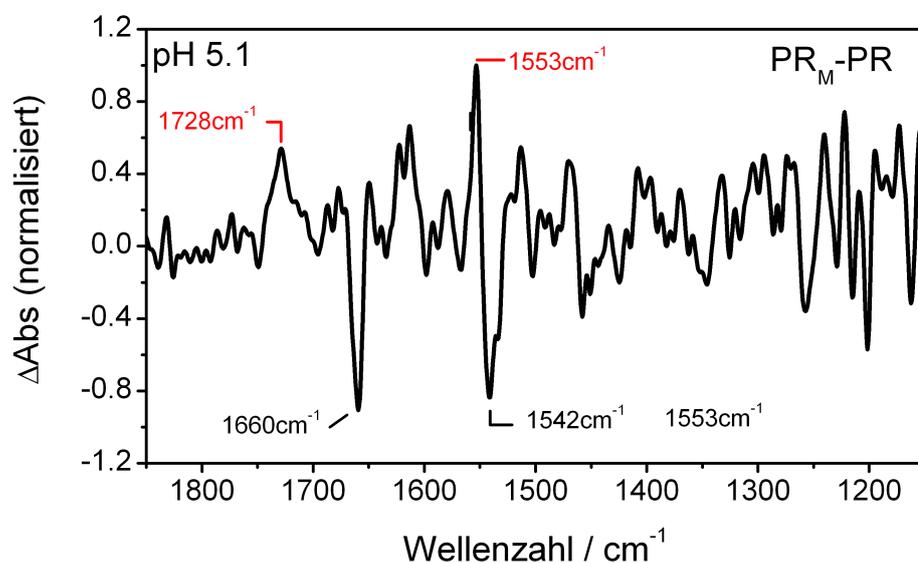


Abb. 5.20: Differenzspektrum PR_M -PR bei pH 5,1. Auffällig ist die Bande 1728 cm^{-1} und die Beiträge der Amide II-Bande. (Rapid-Scan Spektrum bei 242 K, transientes Spektrum nach 8 min)

Im Abschnitt mit den Spektren bei pH 9,0 wurde die Protonierung von Asp-97, erkennbar durch die Bande bei 1755 cm^{-1} zusammen mit ausgeprägten Banden im Amid I und II Bereich als Marker für das M-Intermediat gedeutet. Senkt man den pH-Wert auf pH 5,1 so ist diese Seitenkette bereits protoniert und Asp-97 fällt als Empfänger des Protons von der Schiff'schen Base aus. Allerdings ist in Vis-Spektren bei pH 4.0 die Deprotonierung der Schiff'schen Base in Tieftemperaturmessungen beobachtet worden und Photostrommessungen zeigen einen aktiven Transport bei diesem pH-Wert.[98] In Abbildung 5.20 ist ein Differenzspektrum aus einer zeitabhängigen Messung bei 242 K gezeigt. Auch hier findet sich nach dem K-Intermediat bei höheren Temperaturen stets wieder eine Mischung aus Beiträgen verschiedener Intermediate. Generell ist die Signalintensität der Messungen und die Stabilität der Proben bei pH 5,1 deutlich schlechter als bei pH 9,0. Die stärksten Signale liegen im Bereich von 1 mOD während die Signale bei alkalischem pH teilweise über 3 mOD hinausgehen. Zusätzlich zeigen Proben, die bei pH 5,1 länger als 24 h im Kühlschrank aufbewahrt wurden, nur noch die *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung ohne einen nachfolgenden Photozyklus. Bei pH 9,0 sind die Proben unter gleichen Bedingungen über Monate stabil.

Die zentralen Banden des Spektrums in 5.20 sind Amid II Banden bei (-)1542 und (+)1553 cm^{-1} und eine negative Bande bei 1660 cm^{-1} . Zusätzlich ist eine Bande bei 1728 cm^{-1} sehr ausgeprägt und deutet auf die Protonierung einer Asp oder Glu Seitenkette hin. Die Amid II Banden gleichen den Banden für das $\text{PR}_{\text{M}_{\text{pH}9,0}}$ -PR Spektrum, während das 1660 cm^{-1} Signal zwar ebenfalls vorhanden ist, allerdings mit einem umgekehrten Vorzeichen. Damit sind die für ein M-Intermediat erforderlichen Proteinbewegungen vorhanden, jedoch deutet das umgekehrte Vorzeichen im Amid I Bereich auf eine entgegengesetzte Proteinbewegung bei pH 9,0 und 5,1 hin. Mit dem Asp/Glu Signal bei 1728 ist auch der notwendige Akzeptor für das Proton von der Schiff'schen Base vorhanden, allerdings ist aus der bloßen Existenz des Signals noch nicht klar, welche Aminosäure die Funktion von Asp-97 übernimmt.

Der Protonenakzeptor für pH 5,1 muss jedoch in relativer Nähe zum Chromophor sitzen. Da einige Photostrommessungen für eine Inversion der Pumprichtung bei sauren pH-Werten sprechen, wird das gesuchte Asp oder Glu wahrscheinlich auf der anderen Seite des Proteins sitzen (im Vergleich zu Asp-97 mit dem Retinal als Mittelpunkt). An Hand des Homologiemodells von PR ist Glu-108 ein guter Kandidat für den Protonenakzeptor. Diese Annahme stimmt zudem mit Studien von Friedrich et al. [22] und Dioumaev et al. [31] gut überein, in denen ein Signal bei 1728 cm^{-1} bei PR im späten M- und N-Intermediat Glu-108 zugeordnet wurde. Damit sind die grundsätzlichen Anforderungen an ein M-Intermediat - ein Protonenakzeptor und eine Proteinbewegung - erfüllt.

Um die Zuordnung des Bandenmusters zu einem hauptsächlich von PR_{M} -PR dominierten Differenzspektrum weiter zu unterstützen, wurden gleichzeitig IR und VIS-Spektren an derselben Probe aufgenommen. Aus den UV/Vis Spektren wurde auch hier ein $\text{PR}_{\text{belichtet}}-\text{PR}_{\text{dunkel}}$ Spektrum berechnet. Das Vis-Spektrum bei 237 K 8 min nach Belichtung (vgl. 5.21 rechts) zeigt eindeutig eine Bande bei 425 nm, die der Deprotonierung der Schiff'schen Base und damit dem M-Intermediat entspricht. Da es sich wieder um eine Mischung von Intermediaten handelt, sind zusätzlich Banden bei (-)530 und (+)600 nm zu erkennen, die zum ausgebleichenen Grundzustand (530 nm) und zu den späten Intermediaten (600 nm) gehören. Die Bande bei 380 nm rührt von freiem Retinal her und stammt daher von einem kleinen Anteil denaturiertem Protein. Auf der linken Seite der Abbildung ist das zeitgleich aufgenommene Spektrum zu sehen. Im Gegensatz zu Abbildung 5.20 sind hier allerdings nicht mehrere aufeinander folgende Spektren gemittelt worden und das S/N-Verhältnis ist daher deutlich

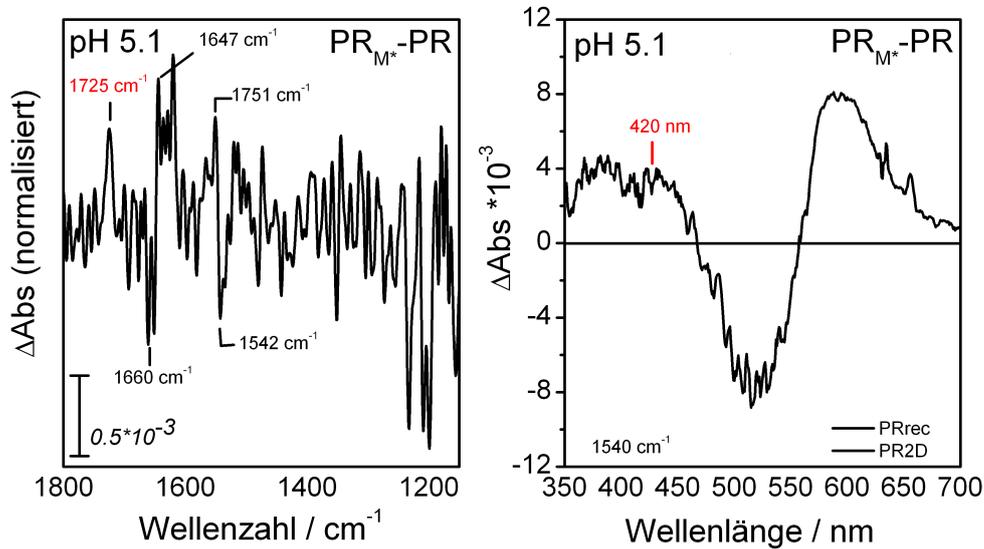


Abb. 5.21: Differenzspektrum PR_{M^*} -PR bei pH 5,1 und das dazu gehörige Vis-Differenzspektrum. Beide Spektren zeigen übereinstimmend Beiträge eines M-Intermediats. (Spektrum bei 237 K, transientes Spektrum nach 8 min im IR und VIS Spektralbereich)

schlechter. Nur so kann man allerdings von einer Zeitgleichheit der beiden Messungen sprechen.

Auch in diesem Spektrum sind die Amid II ((-)1542 und (+)1551 cm^{-1}) und Amid I ((-)1660 cm^{-1}) Beiträge des M-Intermediats wieder klar sichtbar und auch eine Protonierung im Asp/Glu-Bereich bei 1725 cm^{-1} findet statt. Die kleinen Abweichungen zu Abbildung 5.20 in der Bandenposition sind durch die schlechte Signalqualität, die unterschiedliche Anzahl der Mittelungen und damit der unterschiedliche Anteil der verschiedenen beteiligten Intermediate an dem Spektrum und die Wellenzahlenauflösung erklärbar. Durch den Vergleich der beiden spektroskopischen Methoden können die Hauptbanden in den Spektren in 5.21 und 5.20 ganz eindeutig einem M-Intermediat zugeordnet werden. Die Abwesenheit des M-Intermediats in StepScan [22, 31] und Blitzlichtphotolyse-Messungen [22, 35] kann daher nur durch eine langsame Deprotonierung der Schiff'schen Base und eine schnelle Reprotonierung bei Raumtemperatur erklärt werden. Dadurch wäre die Population im M-Intermediat, wie in Abbildung 5.12 gezeigt, bei RT sehr gering und spektroskopisch nicht fassbar. Die Absenkung der Temperatur beeinflusst vor allem die großen Bewegungen des

Proteinrückrats. Damit wird verständlich, warum die Energiebarrieren ausgerechnet für das M-Intermediat so stark beeinflusst werden und warum das M-Intermediat bei Tieftemperaturmessungen akkumuliert werden kann.

Da allerdings die Freisetzung des Protons in die Proteinumgebung aus den IR-Daten nicht hervorgeht, lässt sich die Frage nach einem gerichteten Protonentransport nicht aus den bisherigen Messungen beantworten. Normalerweise werden BLM oder 'patch clamp' Verfahren benutzt, um die Protonenpumpenaktivität von PR zu messen [27, 22, 98, 99, 100]. Diese Verfahren können aber nicht gleichzeitig mit IR-Techniken in derselben Probe verwendet werden und können die Frage der Pumpaktivität und -richtung in den hier verwendeten Proben nicht aufklären. Ein interessanter Ansatz für dieses Problem ist die Verwendung eines intrinsischen pH-Sensors in den IR-Messungen.

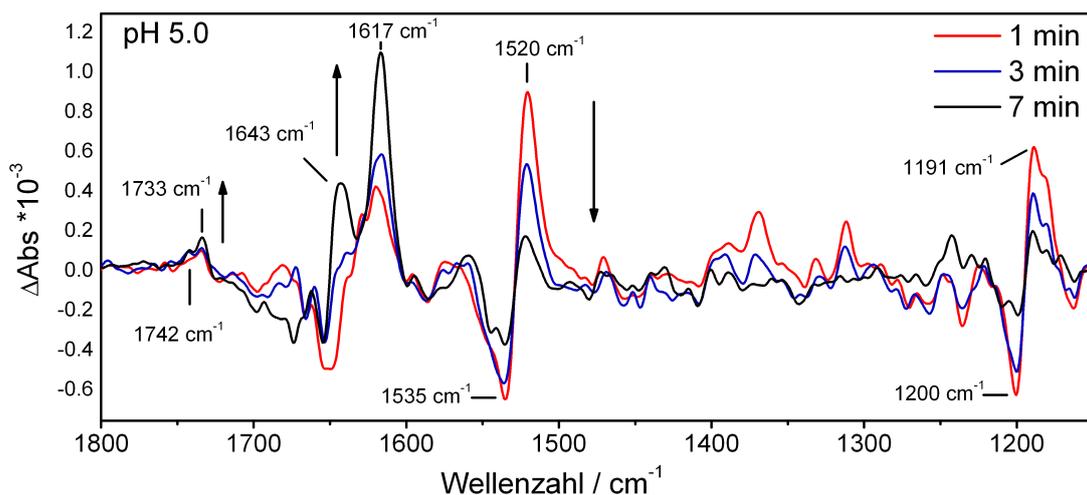


Abb. 5.22: Differenzspektrum PR_M -PR bei pH 5.0 in Molybdat-Puffer (227 K). Die Spektren zeigen einen Übergang vom K- zum M-Intermediat und die damit verbundene lokale pH-Änderung.

Üblicherweise werden pH-sensitive Farbstoffe verwendet, wenn es darum geht, die Freisetzung von Protonen zu beobachten. Hier wurden allerdings die pH-sensitiven Banden eines Molybdatpuffers verwendet um den gewünschten Effekt zu erzielen. Molybdat (MoO_4^{2-}) koordiniert ober- und unterhalb der Ebene der Sauerstoffatome zwei Wassermoleküle, deren IR-Banden sehr empfindlich auf kleine Schwankungen in der H^+ -Konzentration reagieren. Die zwei IR-Banden bei 1617 und 1643 cm^{-1} stammen von der (δ_{OH}) Biegeschwingung der lokalisierten Wassermoleküle.[101] In Ab-

bildung 5.22 sind drei transiente IR-Differenzspektren 1, 3 und 7 min nach der Anregung der Proben in Molybdätpuffer mit pH 5.0 bei 227 K gezeigt. Während der Phosphatpuffer bei pH 5,1 an die Grenzen seiner Pufferkapazität stößt, kann Molybdätpuffer auch bei niedrigeren pH-Werten noch als stabiles Puffersystem fungieren. Das Differenzspektrum setzt sich aus den Einflüssen eines langsam verschwindenden K-Intermediats und den immer ausgeprägter werdenden Signalen des M-Intermediats und ersten Banden der späten Intermediate zusammen. Die Markerbanden für das K-Intermediat sind wieder die C=C und C-C Banden des Retinals bei $(-)$ 1535, $(+)$ 1520, $(-)$ 1200 und $(+)$ 1191 cm^{-1} . Der rechte Pfeil in der Abbildung markiert die langsam verschwindende Bande bei 1520 cm^{-1} . Die folgenden Intermediate werden durch das Auftauchen einer Bande im Amid II Bereich bei 1560 cm^{-1} und durch Signale in der Asp/Glu-Region bei $(+)$ 1742 und 1733 cm^{-1} gekennzeichnet. Mit dem Übergang vom K-Intermediat in die späteren Intermediate tauchen erstmals die Banden der pH-sensitiven Wassermoleküle des Puffers auf. Damit findet eine lokale pH-Änderung in dem Moment des Photozyklus statt, in dem das M-Intermediat präsent ist. Damit können die kontrovers diskutierten BLM Messungen, die eine Pumpaktivität im Säuren für PR vorhersagen, auch in Proteinfilmen mit einer spektroskopischen Methode nachgewiesen werden.

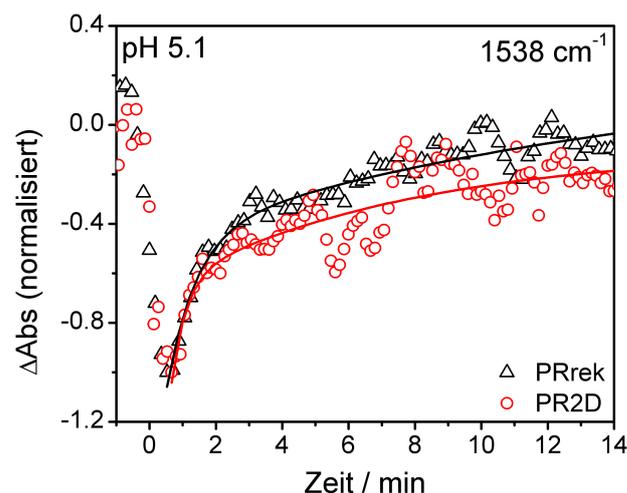


Abb. 5.23: Transienten bei 1538 cm^{-1} (C=C Streckschwingung des Retinals) aus Differenzspektren PR_M -PR bei pH 5,1 und 237 K. Die Transienten für beide Probenpräparationen PRrek und PR2D zeigen die Erholungszeit für das isomerisierte Retinal.

Für die Differenzspektren bei pH 5,1 ist zudem erneut die Frage interessant, ob die Probenpräparation einen Einfluss auf die Kinetiken hat. Nachdem bereits festgestellt wurde, dass die PR2D Proben deutlich stabiler bei pH 5,1 sind als die PRrek Proben, wurden in Abbildung 5.23 die Transienten für 1538 cm^{-1} bei 237 K für PR2D und PRrek gegenüber gestellt. Im Gegensatz zu den pH 9,0 Messungen findet sich hier ein Unterschied in den Zeitkonstanten (PR2D: $<1\text{ min} / 15\text{ min}$ und PRrek $<1\text{ min} / 6\text{ min}$). Die erste Zeit entspricht wieder der fortschreitenden Isomerisierung des Retinals in der Probe durch die sechzigsekündige Beleuchtung. Danach ändert sich das Bild für die beiden Proben. Dennoch bestehen die Unterschiede hauptsächlich in der Signalintensität und Kinetik, die Differenzsignale sind qualitativ die Gleichen. Nach den vom M-Intermediat dominierten Differenzspektren führt eine längere Wartezeit zu Spektren, die von den späten Intermediaten dominiert werden.

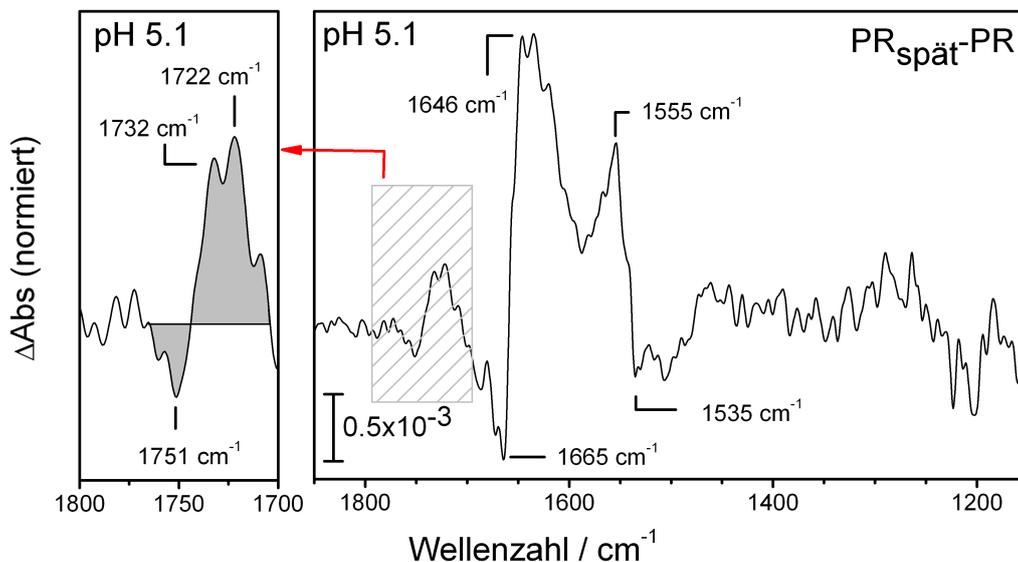


Abb. 5.24: Links: Ausschnittvergrößerung der Asp/Glu-Region für ein pH 5,1 Differenzspektrum bei 242 K 45 min nach der Anregung. Rechts: Komplettes Differenzspektrum mit charakteristischen Amid I und II Änderungen.

In Abbildung 5.24 ist das Spektrum für pH 5,1 bei 242 K 45 min nach der Anregung gezeigt. In der Amid I Region sind Banden bei $(-)$ 1665 und $(+)$ 1646 cm^{-1} zu finden. Ein vergleichender Blick auf Messungen bei BR zeigt, dass dort im PR_N -PR Intermediat

ein ähnliches Muster zu erkennen ist und dort einer Carbonylschwingung des Peptidrückgrats zugeordnet wird.[102] Im Amid II Bereich ist zum einen der Beitrag der C=C Streckschwingung des Retinals bei (-)1535 cm^{-1} vorhanden, zum anderen findet sich ein positives Signal bei 1555 cm^{-1} . Da es keine rotverschobene Komponente neben der C=C-Bande gibt, wird das Spektrum wahrscheinlich vom N-Intermediat dominiert. Da eine solche Bande für das O-Intermediate zu erwarten ist. Zusätzliche Beiträge finden sich erwartungsgemäß in der Asp/Glu-Region bei 1722 (wahrscheinlich Glu-108) und 1732 cm^{-1} . Die Bande bei 1732 cm^{-1} ist ohne Studien mit Mutanten der wichtigsten Asp und Glu Aminosäuren allerdings schwierig zu zuordnen. In diesem Stadium des Photozyklus kann man aber davon ausgehen, dass das Signal Teil der Reprotonierungskette für die Schiff'sche Base ist. Dafür spricht auch die in der Vergrößerung gut zu erkennende kleine negative Bande (1751 cm^{-1}), die eine Deprotonierung einer Asp- oder Glu-Seitenkette anzeigt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine transiente Deprotonierung von Asp-97. Dies passt auch zu einer im BR_N -BR Übergang beobachteten analogen Bande, die dort auch dem Homolog von Asp-97, Asp-96 zugeordnet wird.[97, 94] Eine alternative Interpretation wäre, dass die Bande zu Glu-245, Glu-50 oder Asp-52 gehört und für die Freisetzung des Protons sorgt. Allerdings haben Studien in BR gezeigt, dass die an der Freisetzung des Protons beteiligten Aminosäuren nicht spektroskopisch verfolgt werden können.

Tab. 5.3: Charakteristische IR-Banden des PR Photozyklus bei pH 5,1

Intermediat	Bandenposition in H_2O (MIR) in cm^{-1}	Bandenzuordnung
K/L	1192, 1200, 1232, 1255 1520, 1540 1300-1400 (4 Banden) 1631, 1650 1744	Retinal (C-C) Retinal (C=C) Retinal (N-H/C-H in plane) Retinal (C=N) Störung Glu-108
M	1553, 1660 1728	Bewegung des Helixbündels Protonierung Asp/Glu
spät (N)	1732 1646/1655 1722	Glu-108 C=O Peptidbindung Protonierung Asp/Glu

5.1.2.4 Der Einfluss kleiner pH-Änderungen auf den Photozyklus

Im Abschnitt mit den K-Spektren von PR konnte man bereits erkennen, das PR auch auf Änderungen von einer halben pH-Einheit reagiert und sich die Energiebarrieren verschieben. Nachdem die gezeigten Spektren klar ein M-Intermediat bei pH 5,1 gezeigt haben, lässt sich die interessante Frage aufwerfen, ob der pK_a -Wert von Asp-97 allein die Grenze zwischen den beiden Protonentransportwegen darstellt. Die K-Spektren lassen allerdings bereits die Vermutung zu, dass diese Aussage so nicht stehenbleiben kann.

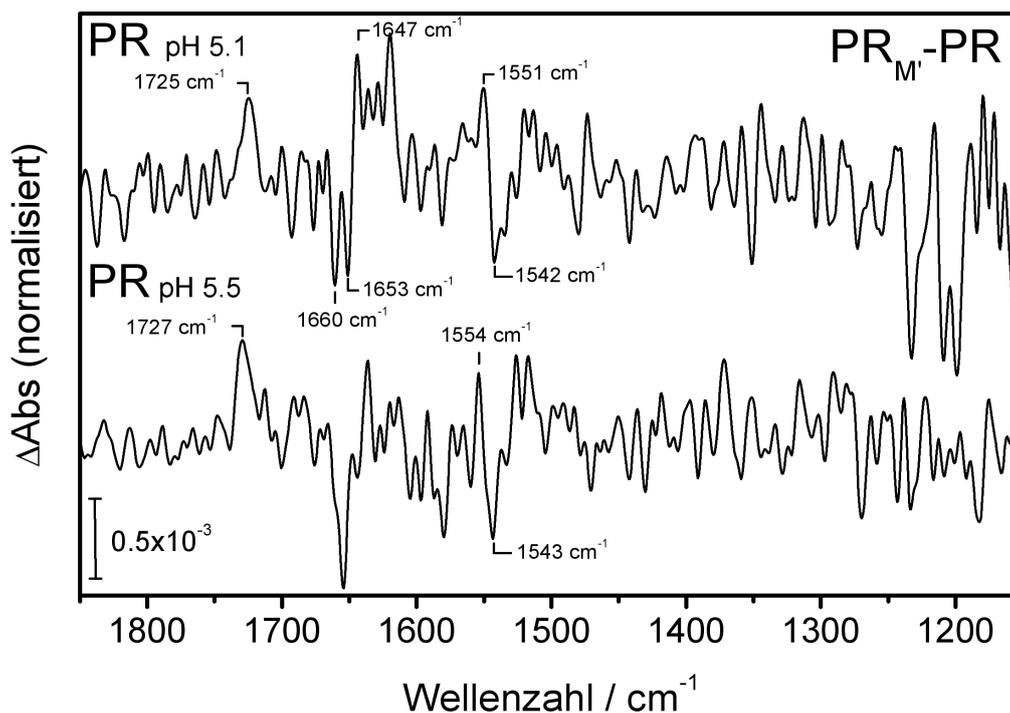


Abb. 5.25: Differenzspektren PR_M-PR bei pH 5,1 und 5,5 8 min nach Anregung der Probe bei 237 K.

In der Abbildung 5.25 sind die PR_M-PR Spektren für pH 5,1 und 5,5 unter den gleichen Bedingungen (237 K, 8 min nach Anregung) gezeigt. Das bei pH 5,5 aufgenommene Spektrum zeigt im wesentlichen die gleichen Differenzbanden wie das Spektrum

bei pH 5,1. Während die Banden in der Asp/Glu-Region in der Intensität für beide Spektren identisch sind und nur eine leichte Verschiebung der Bandenposition zu erkennen ist, ändert sich die Intensität der Banden im Amid I und II Bereich deutlich. Die Banden bei $(-)$ 1653, $(-)$ 1660 und $(+)$ 1647 cm^{-1} sowie bei $(-)$ 1543 und $(+)$ 1554 cm^{-1} fallen im pH 5,5 Spektrum weniger intensiv aus. Gerade diese Banden repräsentieren allerdings die notwendige Proteinbewegung für die Freisetzung des Protons.

In den späten Intermediaten wird der Unterschied zwischen pH 5,1 und 5,5 wie in den K-Spektren erneut deutlich sichtbar (vgl. 5.26). Während die Signale bei 1722 und

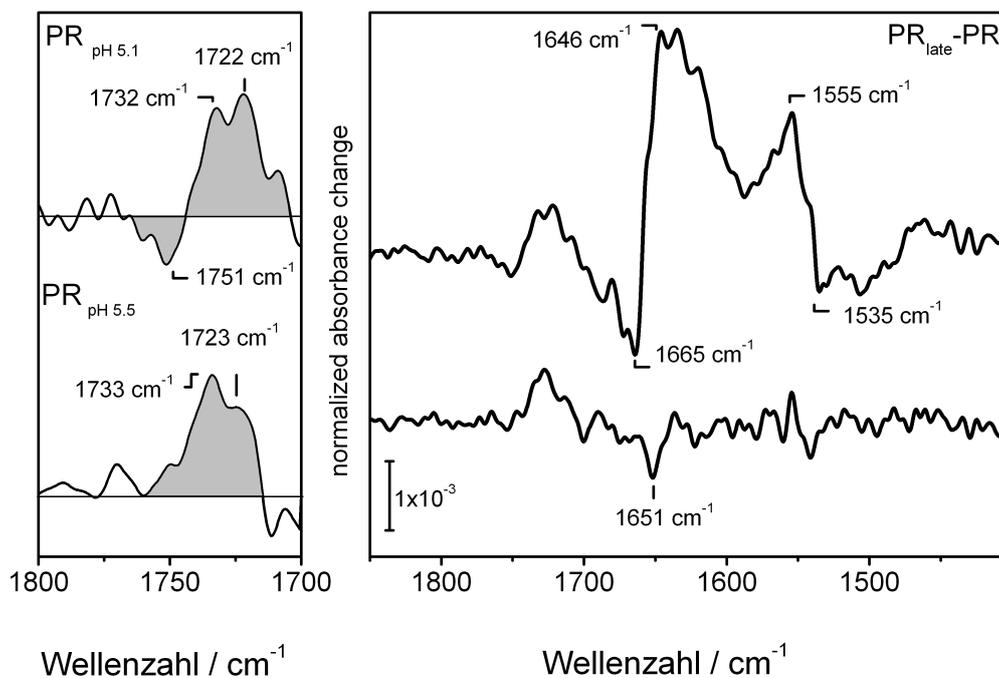


Abb. 5.26: Differenzspektren $\text{PR}_{\text{spat}}-\text{PR}$ bei pH 5,1 und 5,5 bei 242 K. Im Amid I und II Bereich fallen die Unterschiede in den Proben auf. Die kleine negative Bande bei 1751 cm^{-1} fehlt bei pH 5,5

1732 cm^{-1} bei beiden pH-Werten erhalten bleiben, verschwinden die Beiträge bei 1665 und 1646 cm^{-1} fast vollständig durch die Erhöhung des pH-Werts. Auch die negative Bande der transienten Deprotonierung von Asp-97 bei 1751 cm^{-1} lässt sich nur noch erahnen.

Auch die Betrachtung der pH-Abhängigkeit um pH 9,0 zeigt ähnliche Ergebnisse. Die

K-Spektren zeigten auch hier eine veränderte Energielandschaft durch den Wechsel zu pH 8,5. Ein Blick auf das $PR_{M'}$ -PR Intermediat bestätigt diesen Unterschied.

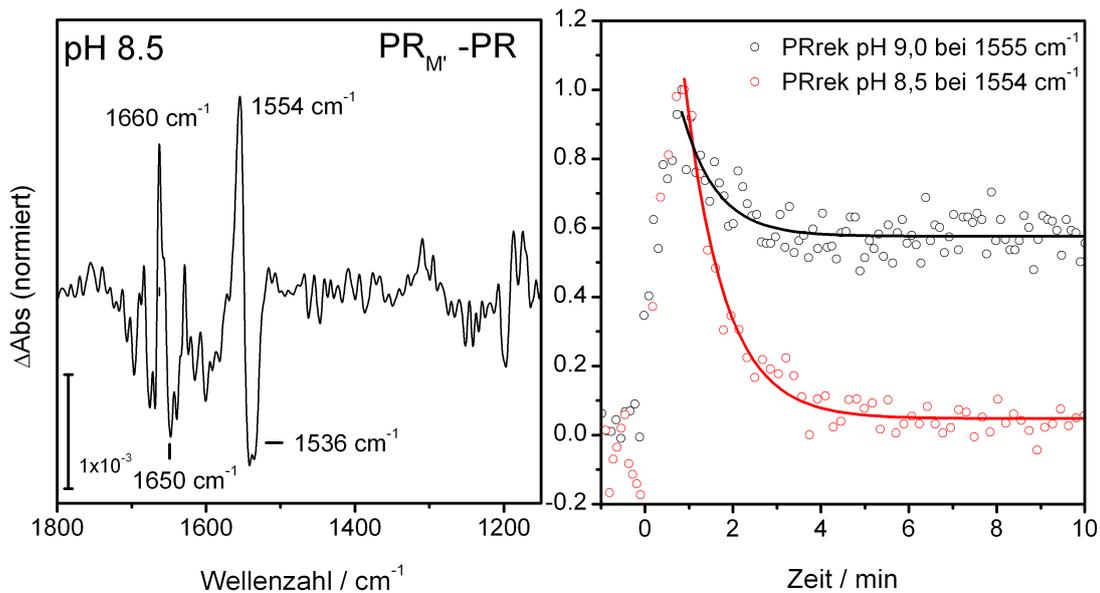


Abb. 5.27: In der Abbildung ist das $PR_{M'}$ -PR Spektrum bei pH 8,5 (257 K und die dazu gehörige Kinetik im Vergleich zu pH 9,0 gezeigt.

In Abbildung 5.27 ist ein Differenzspektrum gezeigt, das unter den selben Bedingungen und etwa zur gleichen Zeit wie das M-Intermediatspektrum bei pH 9,0 (5.17) aufgenommen wurde. Normalerweise würde man auch hier ein Signal im Asp/Glu-Bereich oberhalb von 1700 cm^{-1} erwarten, nämlich das Signal bei 1755 cm^{-1} von Asp-97. Allerdings ist hier noch ein zweites Signal bei 1739 cm^{-1} zu beobachten. Analog zu der bisherigen Interpretation der Bande ist dies eine Änderung in der Protonierung bzw. im Wasserstoffbrückennetzwerk von Glu-108. Die Amid I und II Region spiegelt zwar die Banden des pH 9,0 Spektrums wieder, aber auch hier findet sich eine generelle Abnahme der Intensität der Banden. Auch die Kinetik der Amid II Beiträge bei $(+)$ 1555 cm^{-1} wirft Fragen auf. Die Bande zeigt die Bewegung des Proteins im M-Intermediat an. Auch wenn die Zeitkonstanten (pH 9,0: 47 s, pH 8,5: 54 s) relativ ähnlich sind, so bleibt doch die Frage offen, warum die beiden Proben auf eine unterschiedlich hohe Absorption bei 1555 cm^{-1} zurückgehen. Es ist wahrscheinlich,

dass die pH 9,0 Probe länger einen großen Anteil des M-Intermediat im Gleichgewicht aufweist. Das wiederum lässt auf unterschiedliche Energiebarrieren schließen.

Insgesamt bleibt die Erkenntnis, dass die pH-Abhängigkeit der PR-Filme nicht nur von einem einfachen Zusammenhang, wie einem Mechanismus oberhalb und unterhalb des pK_a -Werts von Asp-97 gesteuert wird. Dazu passt auch die in Abbil-

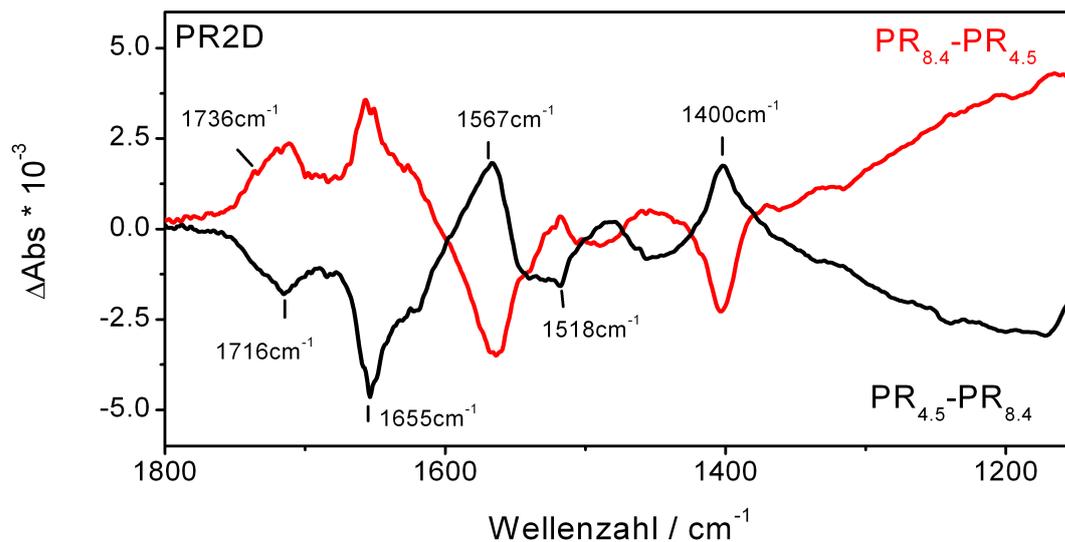


Abb. 5.28: Die Abbildung zeigt die pH-induzierten Differenzspektren $PR_{8.4} \leftrightarrow PR_{4.5}$ für PR2D bei Raumtemperatur. Alle Differenzbanden werden nur durch die pH-Änderung verursacht und zeigen Beiträge von Asp/Glu Seitenketten.

dung ATR gezeigte Titration eines auf einem ATR-Kristall angetrockneten und anschließend mit Puffern überspülten PR-Films. Die Messung wird zwar bei Raumtemperatur durchgeführt, allerdings zeigt sie sehr schön, dass neben Asp-97 weitere (De)Protonierungen von Asp und Glu-Seitenketten möglich sind und mit kleinen Strukturänderungen einhergehen. Da in der enggepackten Proteinschicht vor allem die Außenregionen für das Puffer zugänglich sind, liegen die hier titrierten Aminosäuren wahrscheinlich im Außenbereich des Proteins.

5.1.3 Diskussion

Die grundsätzlichen Fragen nach den Eigenschaften und der Funktionsfähigkeit der PR2D-Kristalle konnte erfolgreich beantwortet werden. Die Kristalle weisen eine stark geordnete Struktur auf und bilden zweidimensionale Schichten, die in Lipidvesikeln eingeschlossen sind. Dennoch sorgt diese rigide Umgebung nicht für eine signifikante Einschränkung in der Funktionsweise des Transportproteins. Die kinetischen

Untersuchungen zeigen einen vollständigen und reversiblen Photozyklus bei pH 9,0. Die IR-Differenzsignale sind identisch mit Spektren für rekonstituierte Proteinproben und beweisen somit, dass PR2D-Kristalle in der Struktur des Monomers identisch sind mit den rekonstituierten Proben. Allerdings sind die Kristalle deutlich stabiler gegenüber Temperatureinflüssen und zeigen auch bei saurem pH-Wert eine längere Beständigkeit. Da die Funktion des Proteins durch die kristalline Umgebung nicht gestört wird und die Probenform im Hinblick auf Stabilität überlegen ist, können die Kristalle für Untersuchungen des PR Transportmechanismus herangezogen werden. Zusätzlich haben die CD-Spektren Hinweise darauf gegeben, dass aromatische Aminosäuren im Außenbereich des Proteins den Kontakt zu benachbarten Monomeren vermitteln. In Bezug auf die postulierten Hexamere in den 2D-Kristallen ergeben sich daraus interessante neue Ansätze, um die Orientierung von PR im Hexamer genauer zu untersuchen.

Die durchgeführten IR- und VIS-Messungen haben des weiteren eine differenziertes Bild vom PR Photozyklus gezeichnet. Der Einfluss des pH-Werts kann und darf nicht außer acht gelassen werden. PR zeigt ein grundsätzlich verschiedenes Verhalten für verschiedene pH Bereiche. Der gut verstandene Photozyklus bei pH 9,0 kann sowohl kinetisch kontrolliert bei Raumtemperatur, als auch unter thermodynamisch dominierten Bedingungen in den Tieftemperatur Messungen beobachtet werden. Die Spektren zeigen eine korrekte *all-trans* zu *13-cis* Isomerisierung und im weiteren Verlauf des Photozyklus ist das M Intermediat mit der Beteiligung von Asp97 klar charakterisiert. Auch die möglicherweise an der Reprotonierung des Chromophors beteiligten Asp und Glu Seitenketten und die typischen Amid I und II Beiträge der späten Intermediate sind vollständig vorhanden.

Dennoch können die verschiedenen Intermediate in den Tieftemperaturspektren zwischen 77 und 257 K nur in einem Gleichgewicht beobachtet werden. Ein einzelnes Intermediat (mit Ausnahme des K-Intermediats) kann nicht isoliert werden, sondern es wandelt sich immer mit einer endlichen Zeitkonstante in ein anderes um. Die vorhandenen Gleichgewichtsreaktionen und damit verbunden das Netzwerk aus Aminosäuren und Wasserclustern, dass zuständig ist für den Protonentransport, sind zudem extrem pH-abhängig. Schon eine Veränderung des pH-Werts um eine halbe pH-Einheit bringt das System aus dem Gleichgewicht. Die Spektren bei pH 8,5 (5,5) zeigen veränderte Energiebarrieren im Photozyklus, die am Auftauchen eine K/L-Intermediats bereits bei 77 K sichtbar werden. Außerdem fallen die für den aktiven Transport essentiellen Strukturänderung des Proteins geringer aus. Allerdings sorgt eine Absenkung

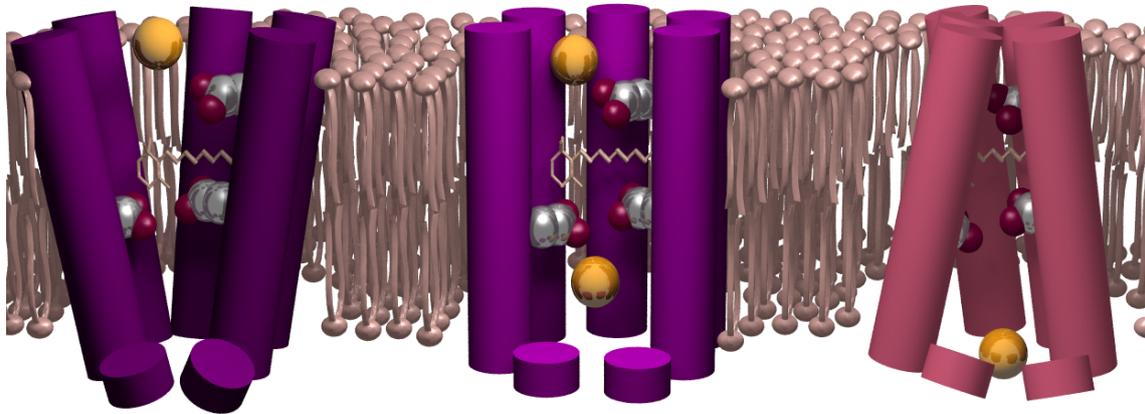


Abb. 5.29: Mechanismus für den Protonentransport über die Membran. Drei große pH-Bereiche kennzeichnen die Funktion von PR: pH 5,1, pH 5,5 bis pH 8,5 und pH 9,0

des pH-Werts auf 5,1 wieder für Spektren, die dem Photozyklus bei pH 9,0 ähneln. Erwartungsgemäß ist das prominente 1555 cm^{-1} Signal für Asp-97 abwesend, da der pK_a -Wert dieser Schlüsselaminosäure zwischen 7 und 8 liegt, allerdings wird im Spektrum für das M-Intermediat bei pH 5,1 klar ersichtlich, dass eine andere Aminosäure diese Funktion übernimmt. Das Signal bei 1728 cm^{-1} lässt sich bisher am wahrscheinlichsten Glu108 zuordnen. Das Vorliegen eines M-Intermediats bei saurem pH wird untermauert durch die parallel zu den IR-Spektren aufgenommenen Vis-Spektren. Die Kombination der beiden Differenzspektren zeigt, dass in dem Gleichgewichtsspektrum ganz klar ein M-Intermediat vorkommt. Entgegen bisherigen Untersuchungen existiert somit dieses entscheidende Intermediat auch im sauren, allerdings lässt es sich nur durch die thermodynamisch kontrollierten Meßbedingungen bei tiefen Temperaturen nachweisen.

Damit muss aber auch die Frage nach dem aktiven Protonentransport bei saurem pH positiv beantwortet werden. Die Spektren zeigen, dass ein Protonentransport bei pH 5,1 möglich ist. Vor allem die Spektren in Molybdatspuffer sind ein Beweis für eine mit dem M-Intermediat verbundene pH-Änderung in der Proteinumgebung. Vor allem kann bei Verwendung dieses Puffers ein pH-Wert von 5,0 sehr gut eingestellt werden und das Puffersystem funktioniert hier - im Gegensatz zu Phosphatpuffer - sehr gut. Damit lässt sich, zusätzlich zu den ohnehin durchgeführten Kontrollen des pH-Werts über die Vis-Spektren, der pH-Wert sicher bestimmen. Ob sich dabei allerdings die

Pumprichtung umdreht, lässt sich nicht abschließend beantworten. Ein Indiz für die Umkehr der Pumprichtung ist allerdings die Rolle von Glu108 als neuer Protonenakzeptor. Glu108 dient bei pH 9,0 als Donor und übernimmt nun die Rolle des Akzeptors, zusammen mit der Position dieser Aminosäure oberhalb des Retinals unterstützen die hier gezeigten Daten die Erkenntnisse aus den Photostrommessungen.[22, 29] Interessanterweise sorgt auch im sauren pH-Bereich eine kleine pH-Änderung auf 5,5 für eine deutlich Veränderung des Photozyklus. Das Spektrum der späten Intermediate enthält keine ausgeprägten Amid II Differenzbanden, die das Öffnen des Proteins begleiten müssten. Auch bei den Asp/Glu Differenzsignalen fehlt die negative Bande für die Deprotonierung des Protonendonors.

Damit lässt sich abschließend ein vereinfachter Mechanismus für das pH-abhängige Verhalten von PR nach der Isomerisierung des Chromophors postulieren (vgl. Abbildung 5.29). Ein aktiver Protonentransport findet um pH 9,0 und pH 5,1 statt, allerdings wahrscheinlich in verschiedene Richtungen. Zwischen pH 8,5 und 5,5 ist der Photozyklus gestört und die großräumigen Helixbewegungen für die Öffnung des Proteins zur extrazellulären Seite bzw. dem Cytoplasma sind nicht mehr ausgeprägt. Damit findet kein gerichteter Transport mehr statt. Interessant ist, dass die pH-Abhängigkeit keinem 2-Zustands-Modell, mit einem gut definierten Übergang zwischen zwei verschiedenen Pumpmechanismen folgt. Es gibt keinen scharfen Übergang zwischen den Zuständen, wie man es für ein System erwarten würde, dass primär durch den pK_a -Wert des Protonenakzeptors Asp97 geprägt ist. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen über die Rolle des His75 im PR und eines vergleichbaren Restes in XR lässt sich damit vermuten, dass der PR Photozyklus zusätzlich zumindest vom pK_a -Wert dieses Histidins beeinflusst wird.

5.2 Käfig-CO₂ und RuBisCO

5.2.1 Nitrophenyllessigsäure als Käfig-CO₂

Carboxylierungsreaktionen sind von so herausragender Bedeutung in der biologischen Energiewandlung, der CO₂-Fixierung zur Bekämpfung des Treibhauseffekts oder industriellen Prozessen, dass sie auf vielfältige Weise untersucht werden. Vor allem in biologischen Systemen erweist sich das jedoch als eine Herausforderung. Vor allem die Präsenz von CO₂ in der Umgebungsluft erschwert die Kontrolle der Studienbedingungen. Generell sorgt CO₂ als gasförmiges Substrat für vielfältige Schwierigkeiten. Um in Lösung zu arbeiten, muss die Konzentration an gelöstem CO_{2(aq)} sorgfältig kontrolliert werden, allerdings ist durch das Gleichgewicht zwischen CO₂ und Kohlensäure eine dauerhaft hohe Konzentration des Substrats schwer zu erreichen.

Um reproduzierbare spektroskopische Untersuchungen von Carboxylierungsreaktionen durchzuführen, ist es notwendig, CO₂ mit präziser Konzentration und nur zu einem genau definierten Zeitpunkt freizusetzen. Zusätzlich muss eine spektroskopische Methode verwendet werden, die den eindeutigen Nachweis von CO₂ auch in kleinen Konzentrationen erbringen kann und eine Quantifizierung der freigesetzten Menge erlaubt. Als ideale Methode bietet sich die IR-Spektroskopie in Kombination mit einer Käfigverbindung für die Freisetzung des CO₂ an. Bisher wurde eine solche Methode noch nicht angewandt, daher müssen zuerst grundsätzliche Fragen zu geeigneten Käfigverbindungen und der Freisetzung von CO₂ in Lösung beantwortet werden. Die wichtigsten Quellen für Probleme und Fehlinterpretationen sind folgende Punkte:

- Abnahme der CO_{2(aq)}-Konzentration durch Hydratisierung und Umwandlung in Hydrogencarbonat
- pH-Abhängigkeit der Hydratisierung und das Verhalten der Proben bei physiologischem pH-Wert (pH 7,5)
- Verwendung der CO₂-Bande als Marker für Enzymreaktionen

- Differenzbanden des Käfigs, die im Spektrum sichtbar sind, müssen aus dem Spektrum korrigierbar sein um darunter liegende Banden zu identifizieren
- Nebenreaktionen mit den verwendeten Puffern
- Carbamatbildung in einfachen Reaktionen ohne die Enzymumgebung
- unspezifische Reaktion von Proteinen mit CO₂

Erst wenn alle diese Punkte geklärt sind, ist es sinnvoll, ein komplexes Problem wie die Aktivierung von RuBisCO mit dieser Methode zu untersuchen.

5.2.1.1 Kurzzeit-IR-Spektroskopie

Eine mögliche Käfigverbindung zur Freisetzung von CO₂ beruht auf dem Prinzip der Nitrophenylkäfige, die sich bereits für andere Substrate etabliert haben. Demnach ist Nitrophenylelessigsäure die einfachste Käfig-CO₂-Verbindung, die nach diesem Muster denkbar ist. Die Photochemie dieser Verbindung ist bereits gut verstanden und lässt sich für die drei Isomere (*ortho*-, *meta*- und *para*-Nitrophenylelessigsäure) in verschiedene Reaktionspfade unterteilen.[103] Generell gilt, dass die Freisetzung von CO₂ nur aus der deprotonierten Form, dem Nitrophenylacetation (NPAA) erfolgen kann. Daher ist die Steuerung des pH-Werts und damit des Anteils des Anions in den Proben für die Reaktionskontrolle wichtig.

Um die Käfigverbindung sinnvoll einsetzen zu können, ist neben der Quantenausbeute auch die Zeitkonstante für die Freisetzung von CO₂ essentiell. Es muss sichergestellt sein, dass bei der Beobachtung der Carboxylierungsreaktionen keine zusätzliche Kinetik durch die fortgesetzte Bildung von Kohlenstoffdioxid eine Rolle spielt, dass also die Freisetzung von CO₂ nicht zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion werden kann.

Die Rapid-Scan Technik ist allerdings zu langsam, um die Freisetzung des CO₂ zu beobachten. Daher wurden in einer Kooperation mit dem Arbeitskreis Wachtveitl (Universität Frankfurt) von K. Neumann und M.-K. Verhoefen Ultra-Kurzzeitmessungen zur NPAA Photolyse durchgeführt.

Dort wurde mit Hilfe von Femtosekunden UV-Pump-IR-Probe-Spektroskopie die Photoreaktion von *o*-, *m*- und *p*-NPAA in 100 mM Phosphatpuffer bei pH 8,5 ver-

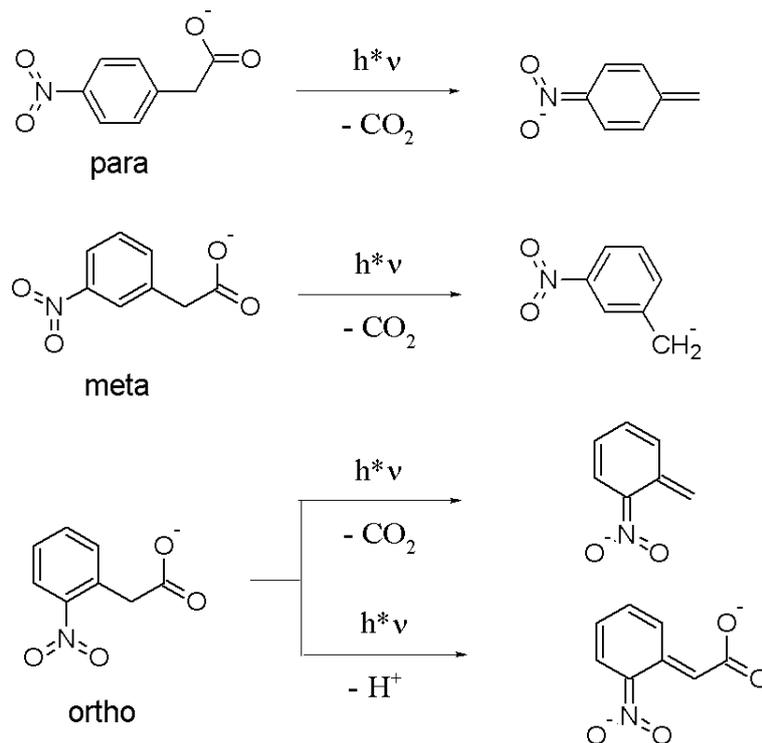


Abb. 5.30: Reaktionsgleichung für die Freisetzung von CO₂ aus Nitrophenylacetat nach [103]. Während *m*- und *p*-NPAA einem geradliniigen Reaktionspfad folgen, ist die Reaktion für *o*-NPAA etwas komplizierter.

folgt. Ein ähnliches Experiment mit anderem Anregungslicht wurde anschaulich in [58] beschrieben. Für die in den Abbildungen gezeigten Spektren wurden die Proben bei 290 nm mit 750 nJ Pulsenergie angeregt. Das Signal des freigesetzten CO₂ wird bei 2343 cm⁻¹ beobachtet. Zusätzlich wird das Spektrum durch weitere Effekte, wie eine 2-Photonen-Absorption des CaF₂-Küvettenfensters und das Lösungsmittel beeinflusst. Durch Messungen unter identischen Bedingungen ohne die Käfigverbindungen können diese Signale aber durch die Subtraktion des Pufferspektrums vom NPAA-Spektrum korrigiert werden.

Die Kinetik der *m*-NPAA Photolyse wurde über den gesamten Wellenzahlenbereich bei mit Hilfe eines globalen Fit mit 3 oder 4 Zeitkonstanten angepasst. Die Ergebnisse des Fits werden in Abbildung 5.32 bei 2343 cm⁻¹ gezeigt. Allerdings beschreiben erst vier Zeitkonstanten die Daten mit ausreichender Genauigkeit. Die Hauptkomponente ist in beiden Fällen eine 200 ps Zeitkonstante, die der Bildung von CO₂ entspricht. Die Zeit $t_4 = \infty$ wird zur Beschreibung des am Ende übrigbleibenden Differenzspektrums benötigt. Die sehr kurze Zeitkonstante beschreibt den im 2D-Spektrum gut zu erkennenden positiven Beitrag über einen breiten Wellenzahlen-

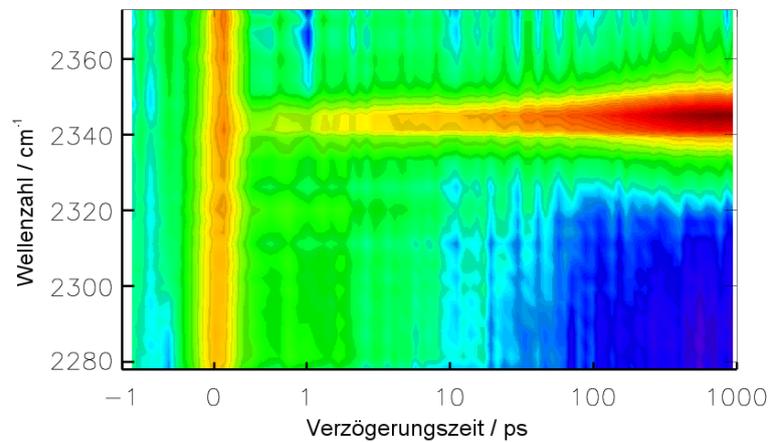


Abb. 5.31: Das korrigierte Spektrum für die Photolyse von *m*-NPAA. Die Beiträge vom Lösungsmittel und den CaF_2 -Fenstern wurden bereits abgezogen. Klar erkennbar ist das auftauchende $\text{CO}_2(\text{aq})$ -Signal bei 2343 cm^{-1} vgl. Abbildung 5.32 und der angeregte Zustand (Quelle: K. Neumann).

bereich und entspricht wahrscheinlich dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustands. Details dieses extrem schnellen Prozesses können nur durch eine Messung im sichtbaren Spektralbereich aufgeklärt werden. Der Unterschied zwischen dem 3- bzw. 4-Zeiten-Modell bildet eine Komponente mit 3.7 ps , die ebenfalls zum Entstehen

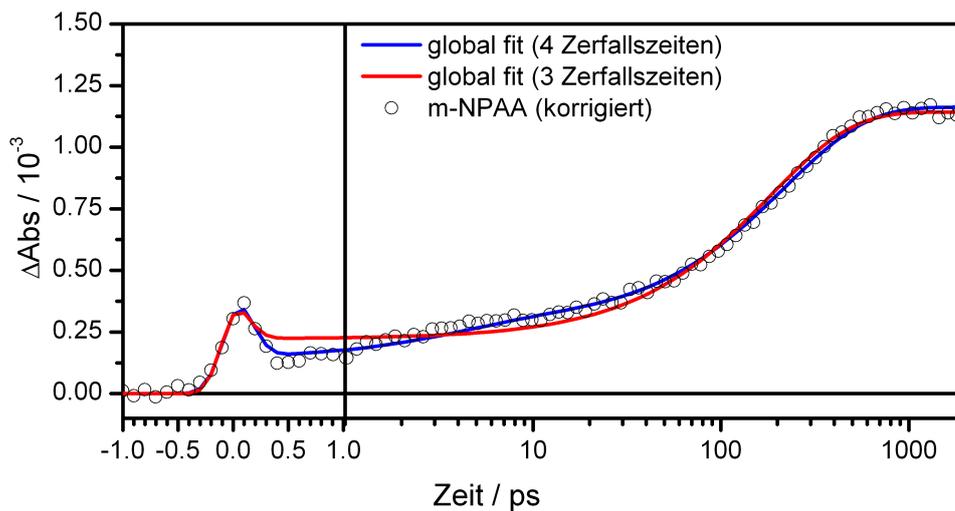


Abb. 5.32: Zeitaufgelöstes Signal bei 2343 cm^{-1} aus den 2D-Daten aus 5.31 und der globale Fit der Daten mit drei und vier Zeitkonstanten (Quelle: K. Neumann).

der CO₂-Bande beiträgt. Die zwei Zeiten für die CO₂-Bildung lassen sich entweder als einen bi-exponentiellen Zerfall aus dem angeregten Zustand der Freisetzung beschreiben oder durch eine Freisetzung aus dem angeregten Zustand für die 3.7 ps Zeit und eine aus dem Grundzustand für die 200 ps Zeit durch Schwingungsprädissoziation. Die zweite Interpretation ist wahrscheinlich, da 200 ps bereits relativ lang sind, um einen einfachen Bindungsbruch zu beschreiben.

Damit bleibt die Erkenntnis, dass die Bildung des CO₂ für *m*-NPAA innerhalb von 2 ns vollständig abgeschlossen ist. Die anderen beiden Isomere, *o*- und *p*-NPAA, wurden ebenfalls untersucht: während *p*-NPAA eine vergleichbare Kinetik aufweist, zeigt *o*-NPAA ein völlig anderes Verhalten. Zwar wird auch eine kleine Menge CO₂ mit derselben Zeitkonstante wie bei *m*-/*p*-NPAA freigesetzt, allerdings bleibt ein Großteil des CO₂ weiterhin gebunden. Wie auch schon der vorgestellte Mechanismus zeigt, dauert die Freisetzung von CO₂ auf dem Hauptweg bei *o*-NPAA deutlich länger. Nur ein kleiner Anteil der *o*-NPAA-Moleküle spaltet schnell (ca. 200 ps) CO₂ ab. Zusätzlich kann durch die Anregung auch nur eine Deprotonierung von *o*-NPAA stattfinden.

Tab. 5.4: CO₂-Freisetzung für *o*-, *m*-, *p*-NPAA nach Daten von K. Neumann und M.-K. Verhofen und [103]

Isomer	Quantenausbeute	Zeitkonstante [ps]
<i>m</i> -NPAA	0,63	200
<i>p</i> -NPAA	0,59	200
<i>o</i> -NPAA	0,04	200

5.2.1.2 Freisetzung von CO₂ und die pH-abhängige Hydrolyse

Mit den bisher bekannten Fakten lässt sich somit sicher vorhersagen, dass die Freisetzung des Substrat aus NPAA nach der Anregung sehr viel schneller verläuft, als es die Rapid-Scan IR-Spektroskopie aufzulösen vermag, die in den nachfolgenden Experimenten zur Anwendung kommt. Damit sind alle beobachteten Kinetiken unabhängig von der Photolyse des Käfigs, da im Rahmen der Fehlergrenzen die Freisetzung instantan erfolgt. Zusätzlich können die IR-Differenzbanden, die durch den Bindungsbruch in der Käfigverbindung entstehen, aus den späteren transienten Spektren herausgerechnet werden. Diese stammen vom CO₂ in der Lösung und dem Käfig, Nitrotoluol, in der Probe.

Sowohl der Mechanismus als auch die Ultra-Kurzzeitmessungen lassen erkennen, dass das *ortho*-Isomer kein geeigneter Kandidat für ein Käfig-CO₂ ist. Auch die IR-Messungen auf längeren Zeitskalen (ms bis s) bestätigen diese Erkenntnis. Daher werden im folgen nur das *para*- und *meta*-Isomer verwendet. Im Gegensatz zu den Kurzzeitmessungen wird für Rapid-Scan-Messungen ein Excimerlaser mit einer Anregung bei 308 nm verwendet.

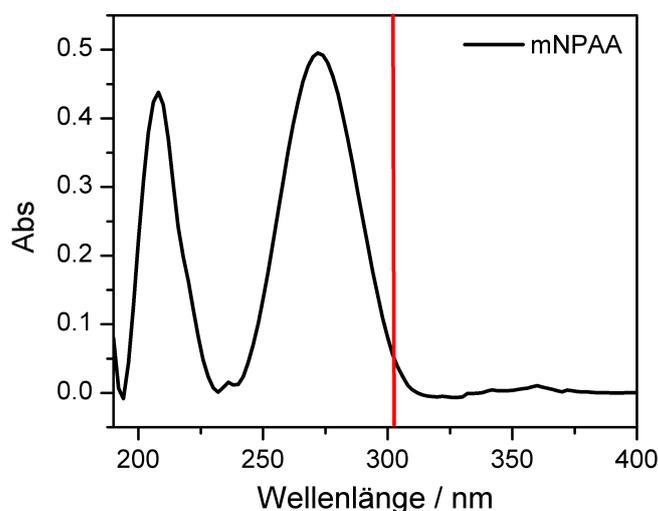


Abb. 5.33: Absorptionsspektrum von mNPAA (Basislinien korrigiert). Die Linie zeigt die Position der Anregung durch den Excimer-Laser.

Dadurch wird nicht länger im Maximum der UV-Absorptionsbande des Käfigs angeregt. Die an der Flanke absorbierte Energie ist zwar ausreichend, um die Photolyse eines Teil der Käfigverbindung zu erreichen, allerdings nicht mehr als zu $\sim 50\%$. Um diesen Effekt auszugleichen, wurde das Käfig-CO₂ in höheren Konzentrationen eingesetzt als stöchiometrisch nötig. Wie bereits zu Anfang erwähnt, sind im IR-Differenzspektrum die Banden des Käfigs ein konstanter Faktor. Ihre Lage wurde daher in einem einfachen Experiment charakterisiert, das gleichzeitig eindrucksvoll die Funktionsweise des Käfigs aufzeigt. In Abbildung 5.34 sind die Käfig_{dunkel}-Käfig_{photolysiert} Differenzspektren für *m*- und *p*-NPAA gezeigt. Die Proben wurden ohne zusätzlichen Puffer in Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge so eingestellt, dass die deprotonierte Form von Nitrophenyllessigsäure, das Nitrophenylacetatanion, vorlag ($pK_a=4.04$ für *p*-NPAA nach [104, 105]). Da außer dem Käfig-CO₂ keine andere pH-sensitive Gruppe in der Probe anwesend ist, können die

Differenzbanden nur von der gebrochenen C-C Bindung stammen und vom neu entstehenden Kohlendioxid. Während CO_{2(g)} eine definierte Doppelbande ausbildet, ist CO_{2(aq)} durch eine einzelne Bande bei 2343 cm⁻¹ charakterisiert.

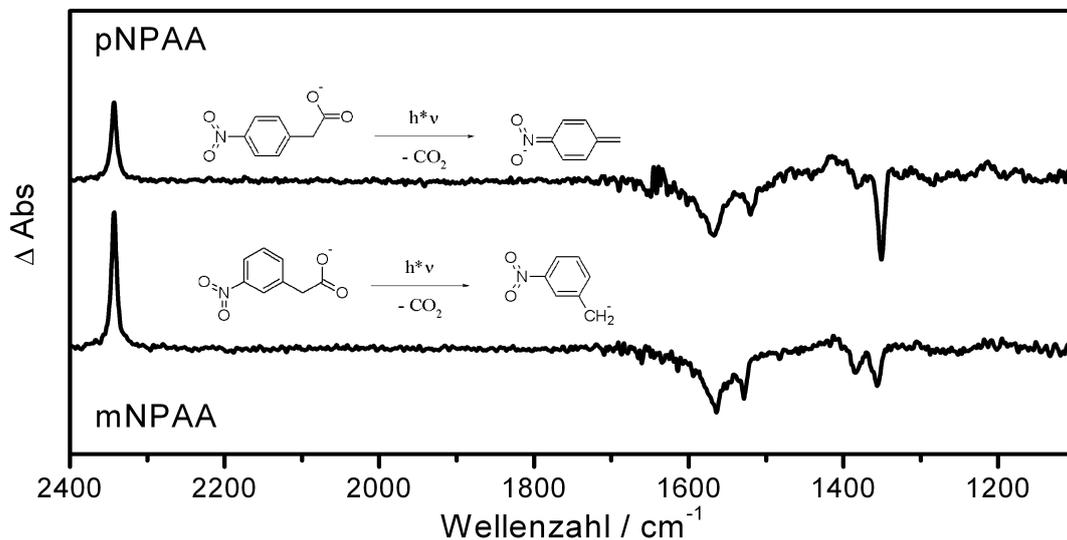


Abb. 5.34: IR-Differenzspektren für *m*- und *p*-NPAA nach der Photolyse der Verbindung durch eine Anregung bei 308 nm (1 Blitz, 512 gemittelte Spektren). Die Proben wurden mit NaOH neutralisiert und ohne eine Pufferung verwendet. Das CO_{2(aq)}-Signal bei 2343 cm⁻¹ ist gut erkennbar. Die negativen Banden stammen vom Acetat.

Im Differenzspektrum ist ganz deutlich die Freisetzung von CO₂ durch die positive Bande bei 2343 cm⁻¹ zu erkennen. Das CO₂ aus der Atmosphäre ist durch die Differenzbildung nicht im Spektrum sichtbar und würde sich bei einer ungleichmäßigen Spülung des Spektrometers während der Hintergrund- bzw. Probenmessung in zwei Banden rechts und links vom gelösten CO₂ zeigen. Die Banden bei (-)1566, 1529, 1385 und 1357 cm⁻¹ für *m*-NPAA und bei (-)1566, 1519, 1385 und 1357 cm⁻¹ für *p*-NPAA stammen von der -COO⁻ Gruppe des Acetats und dem Nitrosubstituenten am Ring. Die Acetatgruppe wird durch die Photolyse abgespalten. Die negativen Banden bei 1566 und 1519/1529 cm⁻¹ stammen von den antisymmetrischen Streckschwingungen der Carboxylat- und Nitrogruppe. Die beiden weiteren negativen Banden bei 1385 und 1357 cm⁻¹ gehören zu den entsprechenden symmetrischen Streckschwingungen der Carboxylat- und Nitrogruppe des Käfig-CO₂. [106, 107] Neben der Zuordnung der Banden benötigt vor allem der kinetische Aspekt dieser Reaktion eine genauere Betrachtung. Aus den Kurzzeitmessungen ist bekannt, dass im ersten Spektrum nach der Photolyse durch den Laser bereits alle lichtinduzierten Reaktionen des Käfigmoleküls inklusive der Freisetzung von CO₂ abgeschlossen sein sollten.

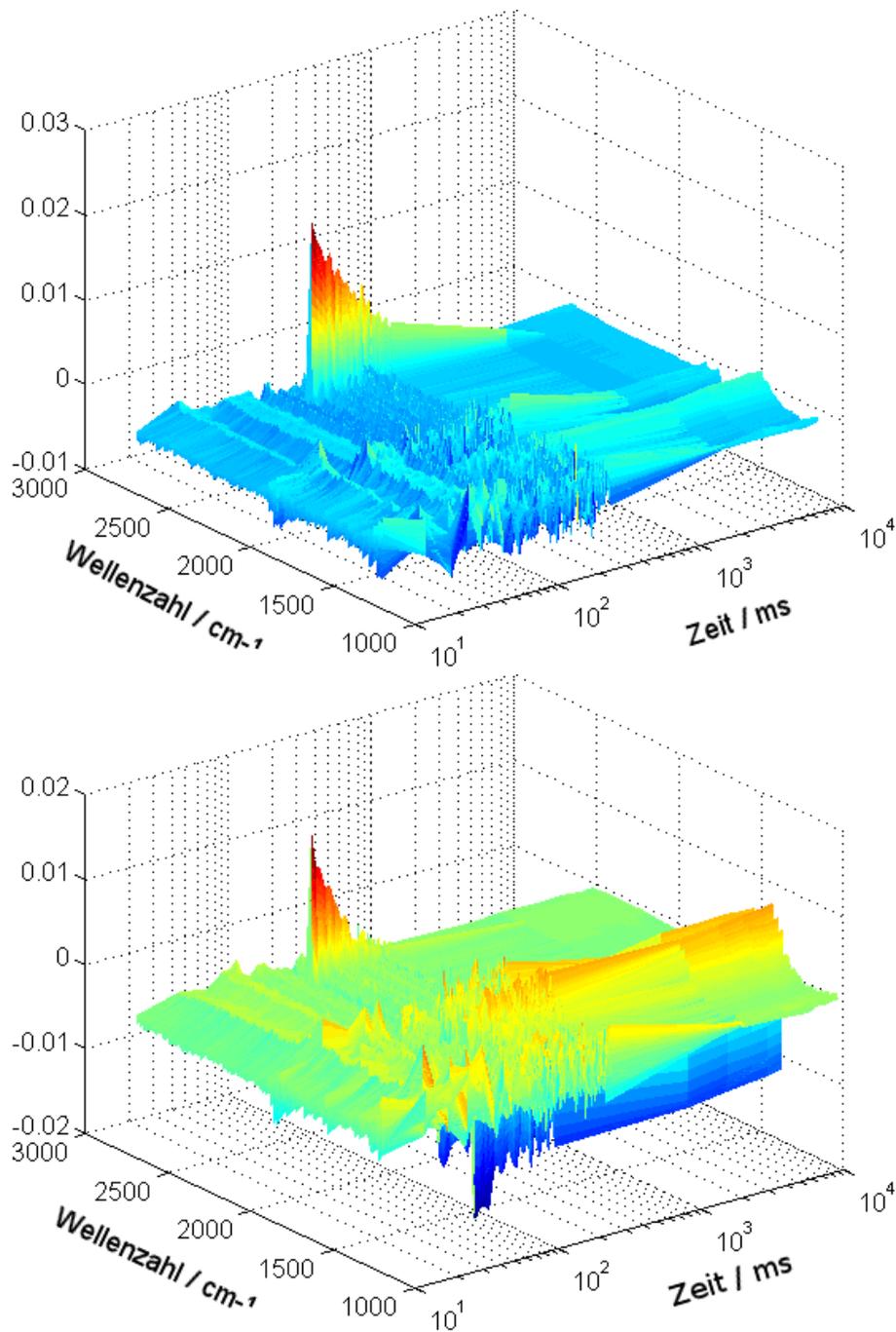
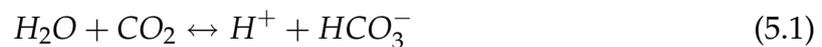


Abb. 5.35: Zeitabhängige Absorptionsänderung für *m*- und *p*-NPAA. Die Proben wurden mit Natronlauge neutralisiert, so dass nahezu vollständig das Acetat in Lösung vorlag. In der zeitlichen Abfolge der Differenzspektren sieht man klar das Verschwinden der CO₂-Bande durch die Hydratisierung des gelösten CO₂, während die Carboxylatbanden konstant bleiben.

In Abbildung 5.35 ist klar ersichtlich, dass zum einen die negativen Banden der Carboxylgruppen statisch sind. Zum anderen ist die Konzentration des gelösten CO₂ in der Probe nicht konstant. Mit fortschreitender Zeit verschwindet die Bande bei 2343 cm⁻¹ des gelösten CO₂ durch die Reaktion mit dem Wasser und die Bildung von Hydrogencarbonat. Das Hydrogencarbonat wird in den Spektren durch extrem breite Banden zwischen 1200 und 1500 cm⁻¹ und 1600 und 1700 cm⁻¹ als Veränderung der Basislinie sichtbar.[108] Man muss sich daher beim Einsatz des Käfig-CO₂ bewusst machen, dass es in wässrigen Lösungen immer eine Konkurrenzreaktion durch die Hydrolyse des CO₂ gibt. Da in Untersuchungen von Proteinen fast ausschließlich bei pH-Werten um 7-8 gemessen wird, muss man die Gleichgewichtskonstante der Hydrolyse in diesem pH-Bereich beachten.



Dieses Gleichgewicht wird sowohl durch die Konzentration des gelösten CO₂ und damit durch die Temperatur, als auch durch die Salzkonzentration und den pH-Wert beeinflusst.[109, 110, 111] Die Gleichgewichtskonstante der Reaktion ergibt sich aus den Konzentrationen der Reaktionspartner.

$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2] + [H_2CO_3]} \quad (5.2)$$

$$\approx \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]} \quad (5.3)$$

Aus der Gleichgewichtskonstante wird ersichtlich, dass vorallem der pH-Wert die Lage des Gleichgewichts entscheidend beeinflusst. Im sauren bis neutralen pH-Bereich liegt das Gleichgewicht nicht vollständig auf Seiten des Hydrogencarbonats. Es verbleibt stets ein Teil des CO₂ in Lösung. Die Henrykonstante für CO₂ bei Standardbedingungen beträgt $k_H = 3.4 * 10^{-2} \frac{mol}{l * atm}$. Bei RT und normalen atmosphärischen Bedingungen lösen sich etwa 5 $\frac{mg}{l}$ des Gases in Wasser. Natürlich sorgt die Hydrolyse des CO₂ dafür, dass neben dem gelösten CO₂ auch Hydrogencarbonat und Carbonat im Wasser vorhanden sind. Teile der Enzymmessungen wurden bei 5 °C durchgeführt und unter diesen Bedingungen löst sich mehr CO₂ im Puffer. Für die Gleichgewichtskonstante K ergibt sich ein Unterschied im Bereich x1.5 für Messungen unter Standardbedingungen oder bei 5 °C ($K_{RT} = 4.45 * 10^7$ und $K_{5C} = 3.04 * 10^7$).[110] Da

die Proben bei Raumtemperatur präpariert werden und mit Öl versiegelt sind, ist die bessere Löslichkeit von CO_2 bei niedrigen Temperaturen für die Menge an freisetzbaren CO_2 aus der Käfigverbindung relevant. Da es sich um ein gasförmiges Substrat handelt, muss die komplette Menge des freigesetzten CO_2 in Lösung gehen, um die Bildung von Gasblasen zu verhindern.

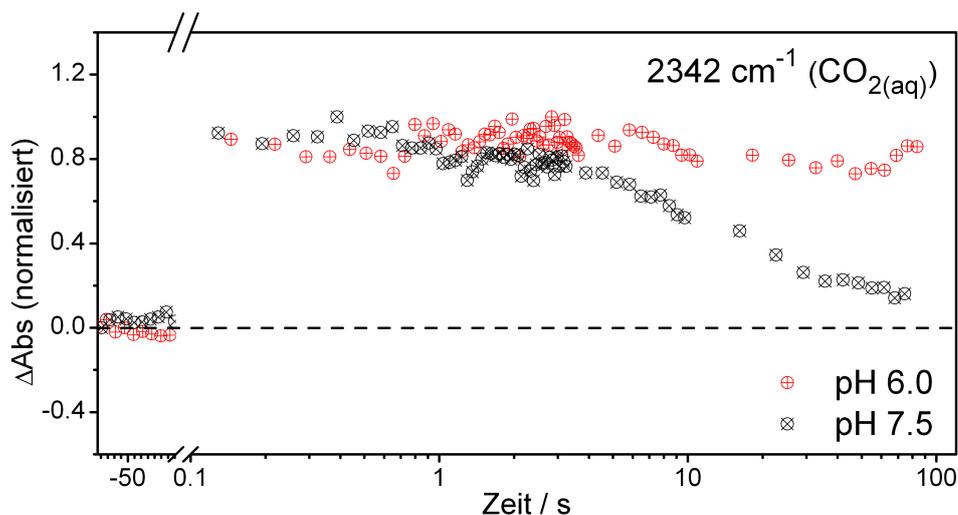


Abb. 5.36: Transienten der CO_2 -Bande bei 2343 cm^{-1} in 100 mM Phosphatpuffer bei pH 6.0 und 7,5. Der Einfluss des pH-Werts auf die Hydrolyse von CO_2 zeigt sich in dem langsamen Verschwinden der CO_2 -Population bei leicht alkalischem pH.

Der Einfluss des pH-Werts auf die CO_2 -Konzentration wird auch aus Abbildung 5.36 gut ersichtlich. Die beiden gezeigten Transienten bei 2343 cm^{-1} sind bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$ in 100 mM Phosphatpuffer mit einer Käfig- CO_2 -Konzentration von 20 mM aufgenommen worden. Im ersten Abschnitt bis ca. 10 s ist die Konzentration bei beiden Proben noch nahezu konstant, allerdings geht bei pH 7,5 ein größerer Teil des freigesetzten CO_2 in Lösung. Dennoch ist die CO_2 -Konzentration selbst bei pH 7,5 über einen längeren Zeitraum relativ hoch und es bleibt stets ein Prozentsatz des $\text{CO}_{2(aq)}$ in Lösung. Aus den bisherigen Betrachtungen wird daher deutlich, dass die Gleichgewichtslage zwischen gelöstem CO_2 und Hydrogencarbonat eine wichtige Rolle spielt. Dennoch ist die unkatalysierte Gleichgewichtseinstellung im Vergleich zur enzymkatalysierten Reaktion relativ langsam. Gerade auf kurzen Zeitskalen bis 10 Sekunden ist eine aus-

reichend hohe CO₂-Konzentration unter physiologischen Bedingungen gegeben, um die Reaktion eines Proteins mit dem CO₂-Substrat zu beobachten.

Ein generelles Problem bei Messungen mit dem Käfig-CO₂ ist die bereits erwähnte Tatsache, dass bei hohen Konzentrationen so viel CO₂ entsteht, dass sich in der Probe kleine Gasblasen bilden, die bereits mit bloßem Auge zu erkennen sind. In den IR-Spektren äußert sich das durch Basisliniensprünge und eine Veränderung der Bandenform. Um die Blasenbildung zu vermeiden, können nur Käfig-CO₂-Konzentrationen von bis zu 20 mM verlässlich eingesetzt werden. Zusätzlich werden die Proben bei RT präpariert und dann mit Öl versiegelt, um einen Gasaustausch zu unterdrücken. Erst in der versiegelten Form werden die Proben im Probenhalter auf 5 °C heruntergekühlt. Dadurch kann ebenfalls mehr CO₂ aus der Käfigverbindung in der Probe gelöst werden.

5.2.1.3 Katalysierte Hydratisierung von CO₂

Der nächste Schritt bei der Charakterisierung der Käfigverbindung ist die Überprüfung, ob sich die CO₂-Bande als Marker für Enzymreaktionen einsetzen lässt. Durch die Hydrolyse des Substrats und dessen Empfindlichkeit gegenüber Temperatur, Salzkonzentration und pH-Wert ist es sinnvoll, eine Enzymreaktion stets mit der reinen Freisetzung des CO₂ unter ansonsten identischen Bedingungen zu vergleichen. Eine einfache Enzymreaktion mit CO₂ ist die Beschleunigung der CO₂-Hydratisierung durch das Enzym Carboanhydrase. Dieses Enzym beeinflusst somit ausschließlich die ansonsten spontan stattfindende Hydratisierung und beschleunigt diese bis zur Einstellung des Gleichgewichts erheblich. In den IR-Spektren wird daher durch die Verwendung von katalytischen Mengen (<1 µM / ml) die Lage der Differenzbanden nicht beeinflusst. Die Wirkung der Carboanhydrase beschränkt sich auf eine Beschleunigung der CO₂-Hydratisierung und damit in einer veränderten Kinetik bei 2343 cm⁻¹.

Dieser Einfluss der Carboanhydrase auf die Hydrolyse von CO₂ wird an Hand der Transienten in Abbildung 5.37 deutlich. Die beiden Proben unterscheiden sich nur in der Anwesenheit von katalytischen Mengen von Carboanhydrase. Dies reicht bereits aus, um die Hydrolyse um den Faktor 10 zu beschleunigen. Ohne Zweifel dient die CO₂-Bande hier als Marker für die Enzymaktivität und kann zur Beobachtung der Carboanhydrase verwendet werden. Damit ist auch klar, dass Enzymreaktionen, die CO₂ verbrauchen, durch die Kombination aus Rapid-Scan-Datenaufnahme und der definierten Freisetzung von CO₂ beobachtbar werden.

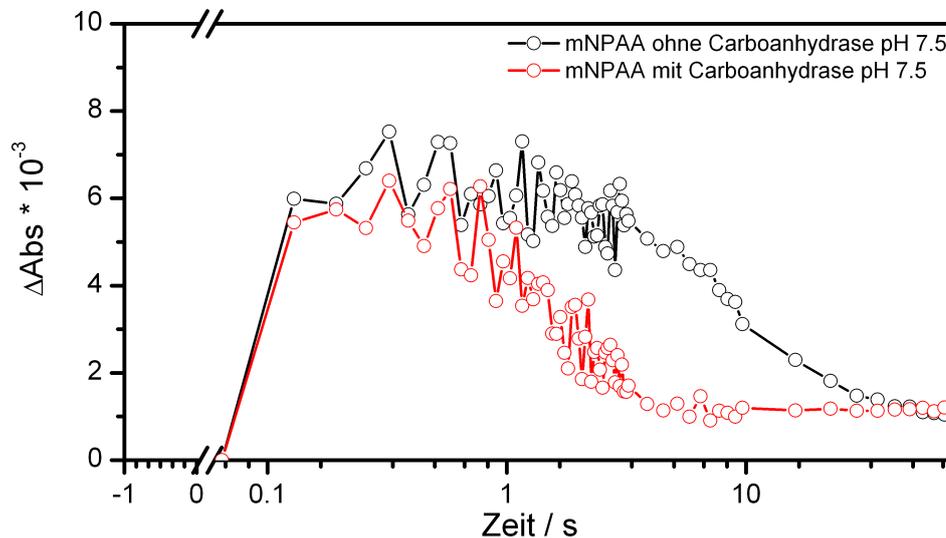


Abb. 5.37: Vergleich der Transienten bei 2343 cm^{-1} für Käfig- CO_2 mit und ohne Carboanhydrase (ca. 1 mg/ml) in 100 mM HEPES bei $\text{pH } 7.5$. Die Zugabe des Enzyms beschleunigt die Hydrolyse etwa um den Faktor 10.

5.2.1.4 Doppeldifferenzspektren und pufferabhängige Banden

Ein weiterer Aspekt der Funktionalität des Käfig- CO_2 ist die Frage, ob die ausgeprägten negativen Differenzbanden des Käfigs tatsächlich vollständig aus den Differenzspektren entfernt werden können. Dies wird nötig, da im Bereich zwischen 1200 und 1600 cm^{-1} eine Vielzahl von Aminosäureseitenketten charakteristische Absorptionen haben. Um die Funktion eines Enzyms aufzuklären, müssen an der Reaktion beteiligte Aminosäuren identifiziert werden, die allerdings durch die Käfigbanden überlagert werden können. Um tatsächlich ausschließlich die Reaktion des CO_2 mit dem Enzym zu beobachten, wird daher ein Doppeldifferenzspektrum gebildet. Dadurch werden statische Banden aus dem Spektrum entfernt und kleine Änderungen unter den negativen Käfigbanden werden sichtbar.

Da die Beobachtung der Aktivierung von RuBisCO Puffersysteme ohne Phosphat erfordert, kann es zusätzlich zur Hydratisierung von CO_2 auch noch zu einer Reaktion mit den tertiären Aminogruppen des als Ersatz für Phosphat verwendeten Puffers kommen.

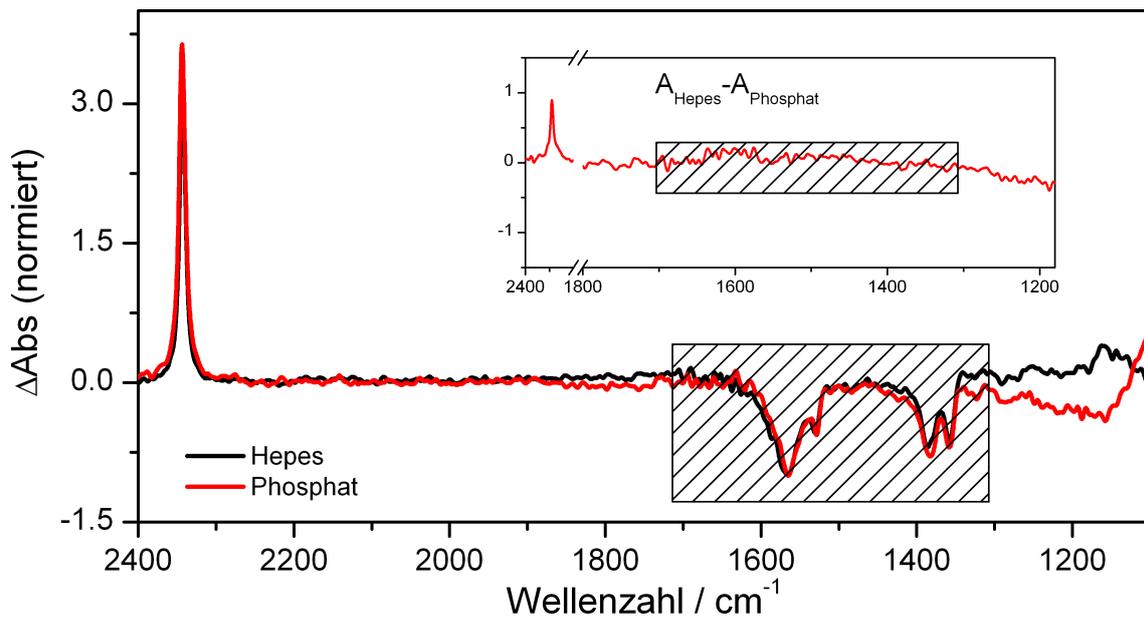


Abb. 5.38: Differenzspektren ca. 1 s nach der Photolyse mit 512 Mittlungen bei pH 7,5 in 100 mM HEPES bzw. Phosphatpuffer. Der Inset zeigt das Doppeldifferenzspektrum der beiden Messungen.

Um dergestaltete Nebenreaktionen auszuschließen und um das Konzept der Doppeldifferenzbildung zu veranschaulichen, wurden Differenzspektren bei pH 7,5 in Phosphatpuffer und HEPES aufgenommen (vgl. 5.38). HEPES ist ein Puffer, der eine tertiäre Aminogruppe enthält und daher möglicherweise mit CO₂ reagiert. Es soll für die RuBisCO-Studien verwendet werden. Da die Bande bei 1566 cm^{-1} von der Carboxylatgruppe vor der Photolyse stammt und nicht (wie die CO₂-Bande) durch Hydrolyse oder ähnliche Folgereaktionen beeinflusst wird, werden die Spektren auf diese Differenzbande normiert. Aus diesen beiden Spektren wird dann das Doppeldifferenzspektrum gebildet. In dem Inset in 5.38 ist gut zu erkennen, dass die Banden des Käfigs sich tatsächlich aufheben und somit eine Konstante im Spektrum bilden.

Damit sind die wichtigsten Fragen zur Funktionalität des Käfig-CO₂ zufriedenstellend beantwortet. CO₂ wird schnell und in ausreichender Konzentration freigesetzt. Die CO₂-Bande kann tatsächlich als Marker für Enzymreaktionen dienen. Auch der Rest des Spektralbereichs lässt sich durch Doppeldifferenzbildung mit einer Referenz von den störenden Carboxylatbanden befreien.

5.2.2 In situ Carbamatbildung

5.2.2.1 Reaktion von CO₂ mit Diethylethanolamin

Ziel der Experimente mit Käfig-CO₂ ist es, die Aktivierung von RuBisCO durch Bildung eines Lysincarbamats zu beobachten. Bevor allerdings der Käfig zusammen mit einem komplexen Protein verwendet wird, ist es sinnvoll die Carbamatbildung an einem kleinen Testsystem zu beobachten. Eine einfache chemische Reaktion ist die Reaktion von CO₂ mit einem substituierten Amin.



Die Reaktion verläuft über einen zwitterionischen Zwischenschritt, auf den die Deprotonierung durch eine Base folgt. Im Falle eines tertiärenamins bleibt die Reaktion im Stadium des Zwitterions stehen, da kein weiteres Proton abstrahiert werden kann. Dergestaltige Prozesse werden in der Industrie häufig für die CO₂-Filterung aus Abgasströmen verwendet.[112] Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Carbamatbildung sinkt in der Reihenfolge primäres Amin > sekundäres Amin > tertiäres Amin. Da erst die Reaktion des tertiärenamins zum Zwitterion genügend langsam ist (ms bis s nach [112]), um im Rapid-Scan-IR beobachtet zu werden, wurde Diethylethanolamin als Reaktand ausgewählt.

Diethylethanolamin (DEA) ist eine flüssige Substanz, die direkt mit dem Käfig-CO₂ enthaltenden Puffer vermischt werden kann. Allerdings ist die Kontrolle des pH-Wert durch die relativ hohe Konzentration des Amins von 25% auch bei einer 200 mM Pufferkonzentration (Phosphatpuffer) schwierig. Da es in dem Experiment allerdings nur darum geht, Banden zu identifizieren, die neben den Käfig-CO₂-Differenzbanden entstehen, ist der eigentliche pH-Wert der Lösung nicht entscheidend. In Abbildung 5.39 sind die Differenzspektren 12 und 24 ms nach der Photolyse gezeigt (1. und 2. Spektrum nach der Anregung). Die CO₂-Bande ist nach 12 ms bereits deutlich weniger ausgeprägt, als in den reinen Käfig-CO₂-Spektren und verschwindet im 2. Spektrum nach der Anregung fast vollständig. Neben den erwarteten Banden für das Carboxylat sind noch zwei weitere ausgeprägte Banden zu erkennen. Die Bande bei 1304 cm⁻¹ ist in den Spektren ohne DEA nicht vorhanden und entspricht der N-C-Schwingung des Zwitterions. Trotz der Verwendung eines tertiärenamins ist die Reaktion so schnell,

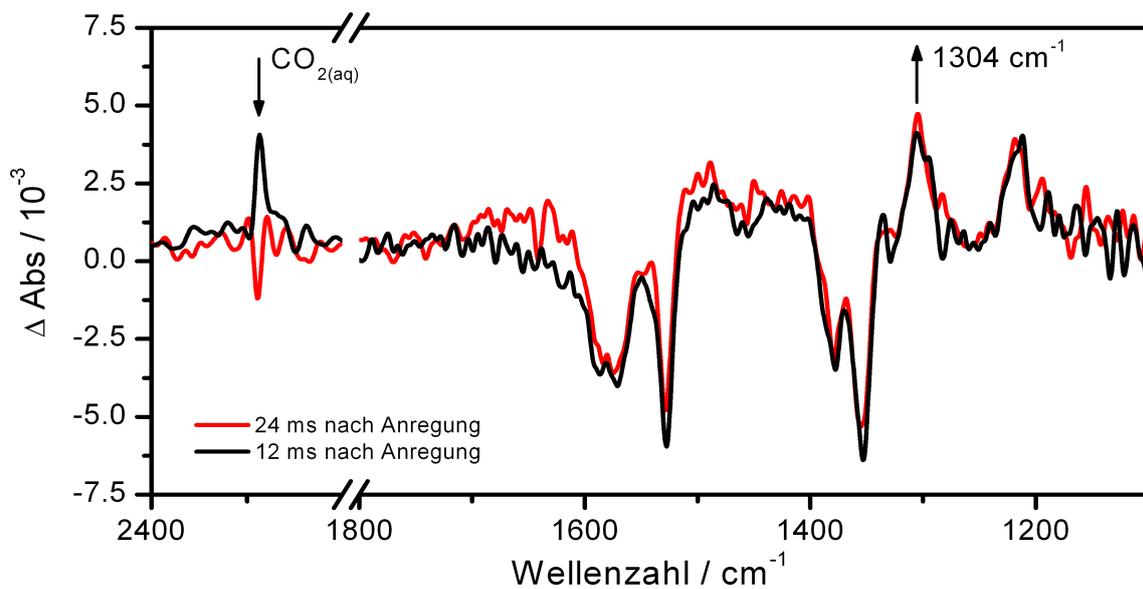


Abb. 5.39: Differenzspektren 12 und 24 ms nach Photolyse des Käfigs in 200 mM Phosphatpuffer pH 7,5 mit DEA. Neben den Banden durch die Photolyse des Käfigs taucht eine charakteristische Bande des Zwitterions bei 1304 cm^{-1} auf.

dass sie die Grenzen der Zeitauflösung der Methode erreicht. Es ist zwar eine kleine Intensitätszunahme bei 1304 cm^{-1} zu beobachten, die mit der Abnahme der CO₂-Bande einhergeht, allerdings ist aus nur zwei Differenzspektren keine Kinetik ableitbar. Die Basislinienverschiebung zwischen 1400 und 1700 cm^{-1} deutet zudem auf eine konkurrierende Hydrolyse des CO₂ hin, die sich in einer breiten Hydrogencarbonatbande äußert.

Es lässt sich dennoch sagen, dass die Carbamatbildung mit dem tertiären Amin gelingt und durch die Differenzbanden und den Einfluss auf die CO₂-Bande sichtbar wird. Die Position der Bande bei 1304 cm^{-1} ist allerdings für das Lysincarbamat in RuBisCO wenig aussagekräftig, da die Reaktion mit DEA nicht vom Zwitterion zum Carbamat fortschreitet und die Bindungseigenschaften der NC-Bindung damit stark abweichen. Dies beeinflusst die Position und Intensität der Carbamatbande.

5.2.2.2 Reaktion von CO₂ mit poly-Lysin

Um sich der Reaktion im aktiven Zentrum von RuBisCO anzunähern, wurde als nächster Schritt die Reaktion von einem Peptid aus ausschließlich Lysinen mit dem freigesetzten CO₂ beobachtet. In RuBisCO wird das Gleichgewicht der Carbamatbildung durch die Bindungstasche beeinflusst, allerdings sollte auch in einem reinen

poly-Lysin genügend Lysincarbat gebildet werden, um die typischen Differenzbanden zu erkennen.

Im Gegensatz zum DEA-Modellsystem wird das poly-Lysin in Konzentrationen verwendet, die denen der späteren Enzymkonzentration ähneln (20 mg/ml).

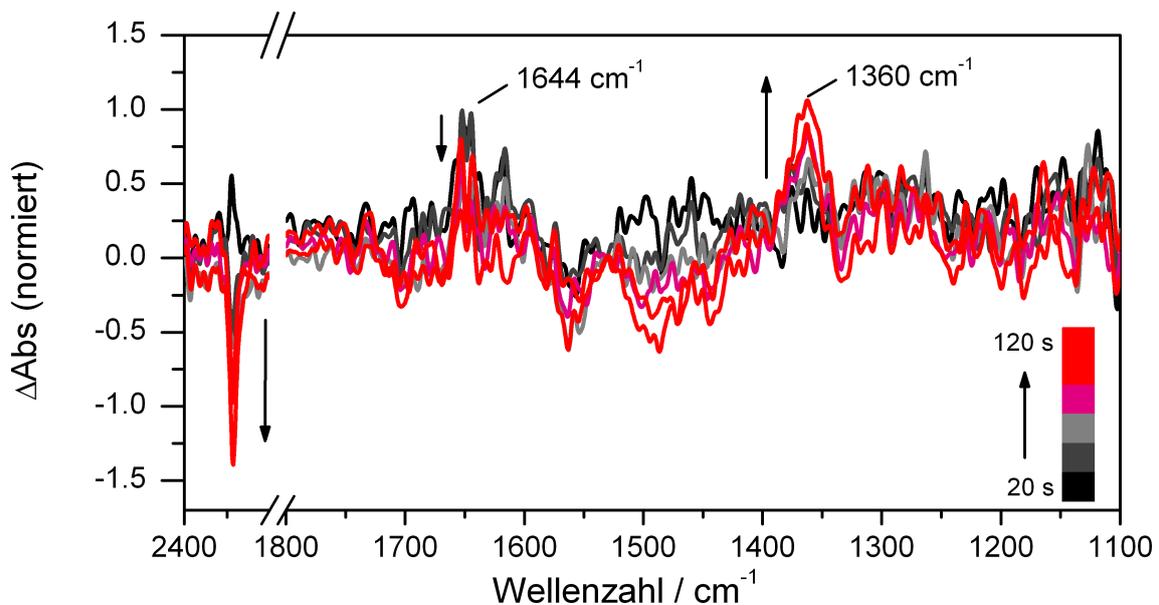


Abb. 5.40: Doppeldifferenzspektren $S_{t_2-t_8}-S_{t_1}$ nach Photolyse des Käfigs in 100 mM HEPES pH 7,5 mit poly-Lysin. Die Spektren wurden im Abstand von 20 s aufgenommen. Neben den Banden durch die Photolyse des Käfigs taucht eine charakteristische Bande für die Entstehung des Carbamats bei 1360 cm^{-1} auf.

Die Doppeldifferenzspektren in Abbildung 5.40 zeigen die zeitliche Entwicklung der CO_2 -Bande und der Banden zwischen 1100 und 1800 cm^{-1} 20 bis 120 s nach der Photolyse. Ein Teil der Reaktion des gelösten CO_2 mit Lysin ist daher bereits abgeschlossen. Zusätzlich ist die anfänglich hohe Konzentration an CO_2 durch die parallel stattfindende Hydratisierung stark vermindert. Allerdings ist bei $5\text{ }^\circ\text{C}$ die Löslichkeit von CO_2 in der Probe höher als bei der Probenpräparation bei Raumtemperatur. Die langsam verschwindende CO_2 -Bande und die gleichzeitig deutlicher werdende Bande bei $(+)1360\text{ cm}^{-1}$ zeigen, dass sich tatsächlich ein Carbamat bildet. Eine fortschreitende Hydratisierung würde durch breite Absorptionsbanden u.a. zwischen 1500 und 1700 cm^{-1} sichtbar und nicht in einer scharfen Bande bei 1360 cm^{-1} . Erwartungsgemäß entsprechen die Differenzbanden durch die Reaktion von CO_2 mit poly-Lysin nicht der Reaktion des Substrats mit DEA. Die Reaktion schreitet hier vom Zwitterion zum deprotonierten Carbamat fort.

5.2.3 Aktivierung von RuBisCO

Nachdem die Bildung eines Carbamats bzw. des Zwitterionenaddukts von CO₂ an ein tertiäres Amin mit Hilfe der Käfigverbindung und der IR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnten, soll auch die Aktivierung von RuBisCO untersucht werden.

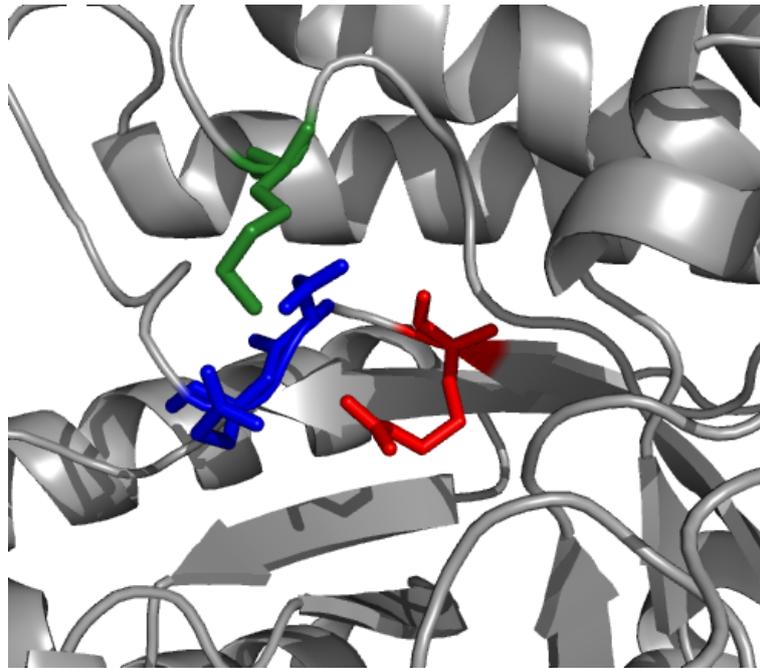


Abb. 5.41: Ansicht des aktiven Zentrums einer kleinen Untereinheit des RuBisCO-Komplexes. In rot ist Lys-201 markiert, das CO₂ als Carbamat bindet. Blau sind Asp-203 und Glu-204, die als Liganden für das Mg²⁺ dienen und in grün ist der Protonenakzeptor/-donor Lys-175 markiert.

Das aktive Zentrum enthält neben dem für die Carbamatbildung zuständigen Lys-201 auch je ein Aspartat und Glutamat, die nach der Ausbildung des Lysincarbamats und der Koordinierung eines Mg²⁺ die Koordinationssphäre des Magnesiumions vervollständigen. Allerdings soll in den Experimenten mit Käfig-CO₂ vor allem die Ausbildung des Lysincarbamats verfolgt werden.

Ein zentraler Aspekt der Aktivierung des Enzyms ist die Tatsache, dass eine Reihe von chemischen Verbindungen wie Phosphat das Enzym inhibieren können. Durch diese Inhibierung von RuBisCO fällt ein wertvoller und bisher standardgemäß für den IR-Spektralbereich verwendeter Puffer weg. Stattdessen wird HEPES-Puffer verwendet, der allerdings 2 tertiäre Aminogruppen enthält. Wie wir aus den Experimenten mit DEA wissen, kann auch ein tertiäres Amin mit CO₂ reagieren. Allerdings wurde bereits in Abbildung 5.38 ein Doppeldifferenzspektrum des Käfigs in Phosphat- und

HEPES-Puffer zeigt, das keine Banden aufweist, die auf eine Zwitterionbildung schließen lassen. Bei Konzentrationen von nicht mehr als 100 mM und vermutlich durch die sterische Hinderung der Amingruppen im HEPES durch ihre Einbindung in ein Ringsystem findet keine Reaktion des Puffers mit dem gelösten CO_2 statt.

5.2.3.1 Die CO_2 -Bande als Marker für die Aktivierung

Analog zu den Experimenten mit der Carboanhydrase, wurde für die Reaktion von RuBisCO mit dem gelösten CO_2 zuerst der Einfluss auf die Transienten bei 2343 cm^{-1} beobachtet. Die Messungen wurden in 100 mM HEPES bei pH 7,5 mit 20 mM Käfig- CO_2 durchgeführt.

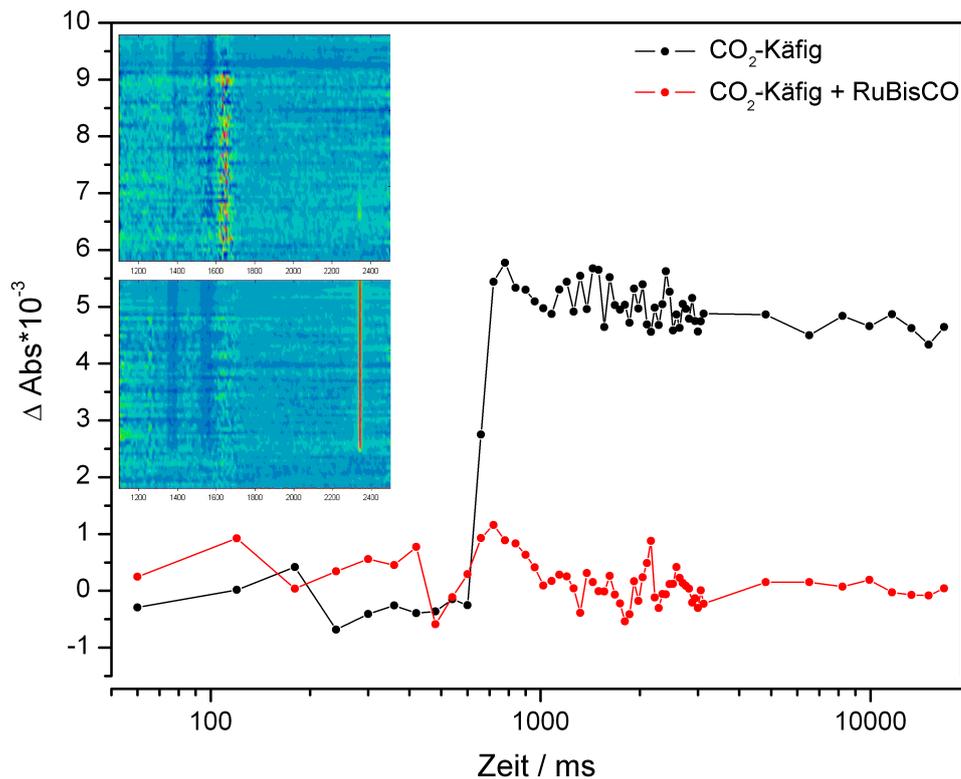


Abb. 5.42: Transienten bei 2343 cm^{-1} für Käfig- CO_2 (10 mM) mit und ohne $\sim 70\text{ mg/ml}$ RuBisCO in 100 mM HEPES-Puffer pH 7,5. Die gesamte 2D-Darstellung für die zeitaufgelösten Differenzspektren ist im Inset zu erkennen. Dort werden vor allem die Banden des Käfigs und die unterschiedliche CO_2 -Konzentration ersichtlich.

Der Vergleich der Transienten für Proben mit und ohne RuBisCO in Abbildung 5.42 zeigt ganz deutlich, dass die Anwesenheit von RuBisCO zu einer sofortigen Abnahme der CO₂-Konzentration führt. Die Bande bei 2343 cm⁻¹ ist nach ca. einer Sekunde nahezu vollständig verschwunden. Wie für einen pH-Wert von 7,5 zu erwarten, bleibt die CO₂-Konzentration in der Referenzprobe hoch und nimmt nur langsam ab. Da das Protein ebenfalls im UV-Bereich absorbiert und die Käfigverbindung auch durch Wechselwirkungen mit den Aminosäureseitenketten beeinflusst werden könnten, muss man allerdings sichergehen, dass auch in der Probe mit RuBisCO tatsächlich CO₂ durch Photolyse entstanden ist. Dazu muss die Information aus den vollständigen zeitabhängigen Differenzspektren zu Rate gezogen werden.

In beiden Proben sind ganz klar die negativen Banden der Carboxylatgruppe bei 1566, 1529, 1385 und 1357 cm⁻¹ zu erkennen. Damit ist klar, dass die Photolyse durch die Anwesenheit von RuBisCO nicht unterbunden wird. Die Konzentration des Enzyms ist nicht exakt bestimmbar, wenn allerdings Probenpräparation und Aufkonzentrierung in Betracht gezogen werden, so ergibt sich eine Konzentration von ~70 mg/ml. Rubisco hat pro Enzymkomplex mit 560 kDa 16 Untereinheiten, 8 große und 8 kleine, mit jeweils einem aktiven Zentrum. Damit ergibt sich eine Konzentration an aktiven Zentren von ~1 mM. Da das Käfig-CO₂ nur an der Flanke angeregt wird, ist es einleuchtend, dass die Proteinkonzentration hoch genug ist, um das gelöste CO₂ vollständig zu binden. Kleinere Unterschiede in der Intensität der Differenzbanden lassen sich zudem durch Schwankungen in der Schichtdicke erklären. Die Banden des Käfigs sind auf jeden Fall proportional zur Anfangs freigesetzten CO₂ Menge, da für jede abgespaltene Carboxylatgruppe auch ein Molekül CO₂ entsteht. Damit lässt sich zeigen, dass RuBisCO tatsächlich einen Einfluss auf die Konzentration des gelösten CO₂ hat.

Ein weiterer Aspekt bei der Dateninterpretation ist die Tatsache, dass RuBisCO selbst nach der ausführlichen Reinigung noch mit Spuren anderer Proteine aus Spinat verunreinigt sein könnte. Die Experimente mit Carboanhydrase haben gezeigt, dass katalytische Mengen ausreichen, um die Hydrolyse des CO₂ entscheidend zu beschleunigen. Sollte die RuBisCO-Probe mit der Spinatcarboanhydrase verunreinigt sein, so würde auch das zu einem schnellen Verschwinden der CO₂-Bande führen. Um die Verunreinigung der Probe auszuschließen, wurden das Experiment aus 5.42 mit dem Carboanhydraseinhibitor Acetazolamid durchgeführt.

Dieser inhibiert auch die Carboanhydrase aus Spinat und würde eine katalytische Beschleunigung der Hydrolyse verhindern.[113, 114] In Abbildung 5.43 ist erneut die CO₂-Kinetik für zwei Proben im Standardpuffer (100 mM HEPES mit 10 mM *m*-NPAA

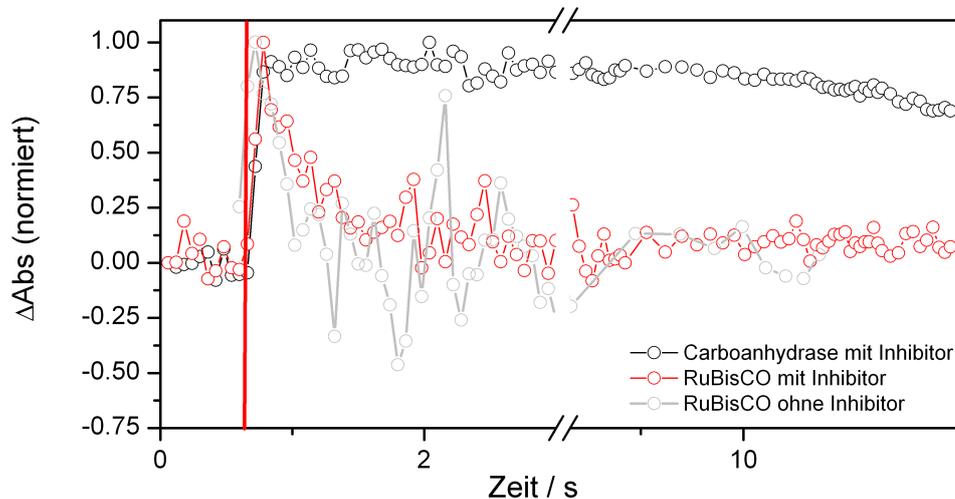


Abb. 5.43: Transienten bei 2343 cm^{-1} für Proben mit RuBisCO und Carboanhydrase in 100 mM HEPES pH 7,5 mit dem Carboanhydraseinhibitor Acetazolamid. Die rote Linie markiert den Moment der Photolyse. Die Anwesenheit des Inhibitors verhindert die Arbeit der Carboanhydrase, aber lässt die Aktivität von RuBisCO weitgehend unbeeinflusst.

bei pH 7,5) gezeigt. Die Proben enthalten entweder RuBisCO oder Carboanhydrase und sind jeweils mit einem Überschuss an Inhibitor versetzt. Während die Carboanhydrasemessung ohne Inhibitor eine schnelle Hydrolyse zeigt (vgl. 5.37), wird ihre Katalyse jetzt durch den Inhibitor unterbunden und die CO_2 -Konzentration bleibt über den beobachteten Zeitraum nahezu konstant. Die Aktivität von RuBisCO wird allerdings durch die Anwesenheit des Inhibitors nicht unterbunden. Zum Vergleich ist zudem die Transiente bei 2343 cm^{-1} für RuBisCO ohne den Inhibitor gezeigt. Das deutlich größere Rauschen erklärt sich aus der geringeren Intensität der Differenzbande. Fest steht, dass das Enzym weiterhin CO_2 verbraucht, allerdings ist aus der Kinetik noch nicht mit Sicherheit ableitbar, dass es sich bei dem Prozess tatsächlich um die Carbamatbildung im aktiven Zentrum handelt.

5.2.3.2 Carbamatbildung im aktiven Zentrum

Der tatsächliche Beweis für die beobachtete Aktivierung von RuBisCO kann nur über die vollständigen Differenzspektren erfolgen, in denen neben den Käfigbanden und CO_2 auch Banden für das Lysincarbamat sichtbar werden. Es muss allerdings auch

in Betracht gezogen werden, dass bei der Größe des Enzyms (560 kDa) auch eine unspezifische Wechselwirkung von Aminosäureseitenketten mit dem gelösten CO₂ für den Abbau der CO₂-Konzentration verantwortlich sein könnte. Daher wurden für die folgenden Messungen vier verschiedene Proben untersucht. Alle enthalten den Standardpuffer 100 mM HEPES pH 7,5 mit 10 mM Käfig-CO₂.

- 1. Eine Probe mit Rinderserumalbumin (BSA), um unspezifische Reaktionen des CO₂ mit Proteinen auszuschließen. BSA enthält 59 Lysine bei einer Masse 66 kDa von denen 30-35 leicht zugänglich sind.[115] RuBisCO enthält 224 Lysine in dem Enzymkomplex mit 560 kDa.
- 2. Eine Probe mit RuBisCO ohne Magnesiumionen als Blindprobe, um den Einfluss von Mg²⁺ auf die Aktivierung des Enzyms zu überprüfen.
- 3. Eine Probe mit RuBisCO mit dem Zusatz von Magnesiumionen, um den Einfluss von Mg²⁺ auf die Aktivierung des Enzyms zu überprüfen.
- 4. Eine Probe mit RuBisCO und Natriumazid (NaN₃), da das zu CO₂ isoelektronische Azid ebenfalls eine inhibierende Wirkung für RuBisCO haben könnte.

Die gezeigten Differenzspektren wurden zu einem Zeitpunkt aufgenommen, an dem die Reaktion (außer der CO₂-Hydrolyse) mit dem Substrat abgeschlossen war. Die Differenzspektren für die Proben 1 und 2 sind (± 2 s) zeitgleich. Zusätzlich zu den Spektren mit Protein wird auch das Differenzspektrum des Standardpuffer in rot in den beiden linken Abbildungen gezeigt (vgl. 5.44). Die erste wichtige Erkenntnis ist, dass es keine unspezifische Reaktion des gelösten CO₂ mit Aminosäureseitenketten gibt. Das Gleichgewicht der Lysincarbamatbildung liegt ohne die gezielte Steuerung durch das aktive Zentrum auf Seiten des ungebundenen CO₂. Das Spektrum mit BSA enthält nur die typischen Banden für das photolysierte Carboxylat und das gelöste CO₂. Sobald allerdings RuBisCO in der Probe ist, verschwindet die Bande bei 2343 cm⁻¹ bei Anwesenheit von Mg²⁺ nahezu vollständig. Zusätzlich wird im Vergleich mit dem reinen Käfigspektrum klar, dass im Bereich 1300 bis 1400 cm⁻¹ ein oder mehrere positive Banden von den negativen Carboxylatbanden überlagert werden. Das Verschwinden der Bande bei 2343 cm⁻¹ ist bei diesem pH-Wert zu schnell, als dass es durch die Bildung von Hydrogencarbonat erklärt werden könnte.

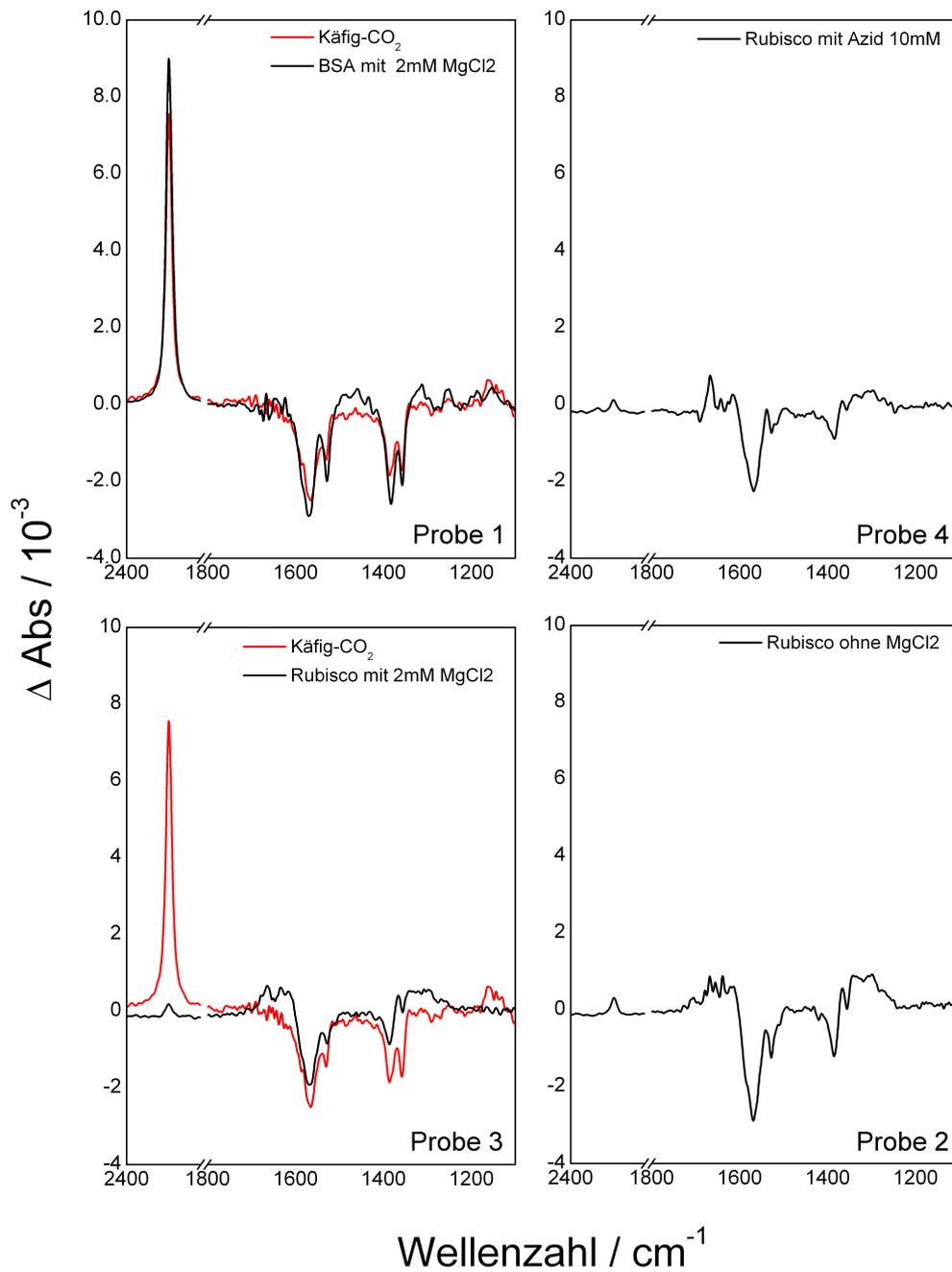


Abb. 5.44: Differenzspektren für die Proben mit BSA/RuBisCO ohne Mg/RuBisCO mit Mg/RuBisCO mit Azid im Standardpuffer pH 7,5. Das rote Spektrum gehört zum Standardpuffer (mit Käfig-CO₂) und wird zum besseren Vergleich links oben und unten parallel zu den BSA- und RuBisCO-Spektren gezeigt. Offensichtlich reagieren nur Proben mit RuBisCO mit dem gelösten CO₂.

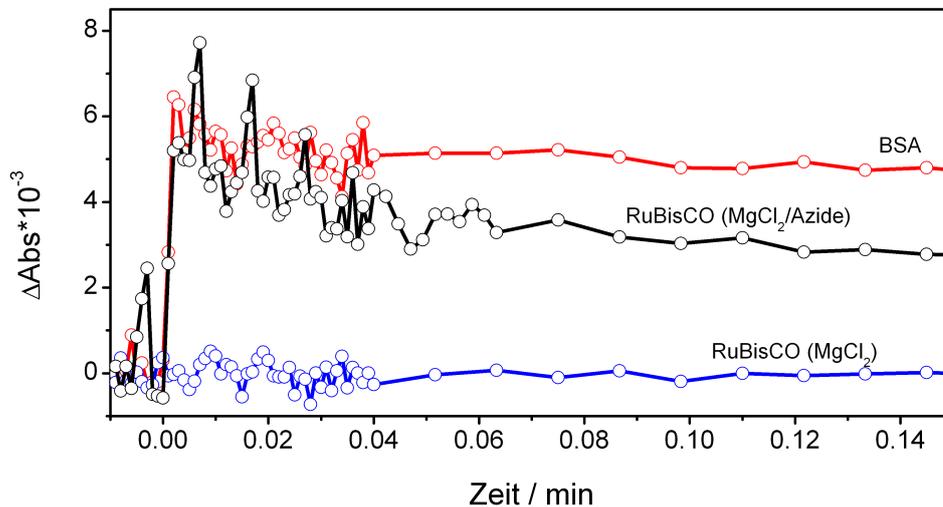


Abb. 5.45: Transienten bei 2343 cm^{-1} für die Proben 1,2 und 4 aus dem vorangegangenen Abschnitt im Standardpuffer. BSA reagiert nicht mit dem gelösten CO₂, während RuBisCO es schnell verbraucht. Die Anwesenheit von Azid verlangsamt die Aktivierung von RuBisCO, kann sie allerdings nicht vollständig aufhalten.

Interessant sind zusätzlich die rechts oben und unten gezeigten Differenzspektren, die ohne Mg²⁺ und rechts oben zusätzlich mit Natriumazid durchgeführt wurden. Aus Kristallstrukturanalysen und Funktionsstudien von RuBisCO ist bekannt, dass im aktiven Zentrum die Koordinationssphäre eines Mg²⁺-Ions durch das Endiol des Substrats und Asp- und Glu-Seitenketten vervollständigt wird, allerdings ist nicht klar, ob das Mg²⁺-Ion bereits für die Bildung des Lysincarbamats notwendig ist. In den Proben ohne Mg²⁺ wurde durch Dialyse mit Ethylendiamintetraacetat(EDTA)-haltigem Puffer (24h bei 5 °C) die Magnesiumionen vollständig aus der Probe entfernt, dennoch wird auch hier das lösliche CO₂ gebunden. Ein weiterer Aspekt der Aktivierung ist die Inhibierung durch Azid, allerdings ist das hier gezeigte Differenzspektrum nicht von den beiden anderen Proben mit RuBisCO zu unterscheiden. Erst der Blick auf die Transiente der CO₂-Bande macht den Einfluss des Azids sichtbar.

Während die Differenzspektren für RuBisCO mit und ohne Azid im Gleichgewicht, d.h. nach Reaktionsende, dasselbe Bandenmuster aufweisen, zeigen die Transienten bei 2343 cm^{-1} deutlich, dass die Azidionen die Aktivierung des Enzyms verlangsamen. Das Azidion ist isoelektronisch mit CO₂ und kann daher offensichtlich im ak-

tiven Zentrum koordiniert werden, allerdings findet keine Reaktion mit dem Lysin statt und das Azid wird im Laufe der Zeit vom CO_2 verdrängt. Das entspricht einer Wirkung als kompetitiver Inhibitor für den Aktivierungsprozess.

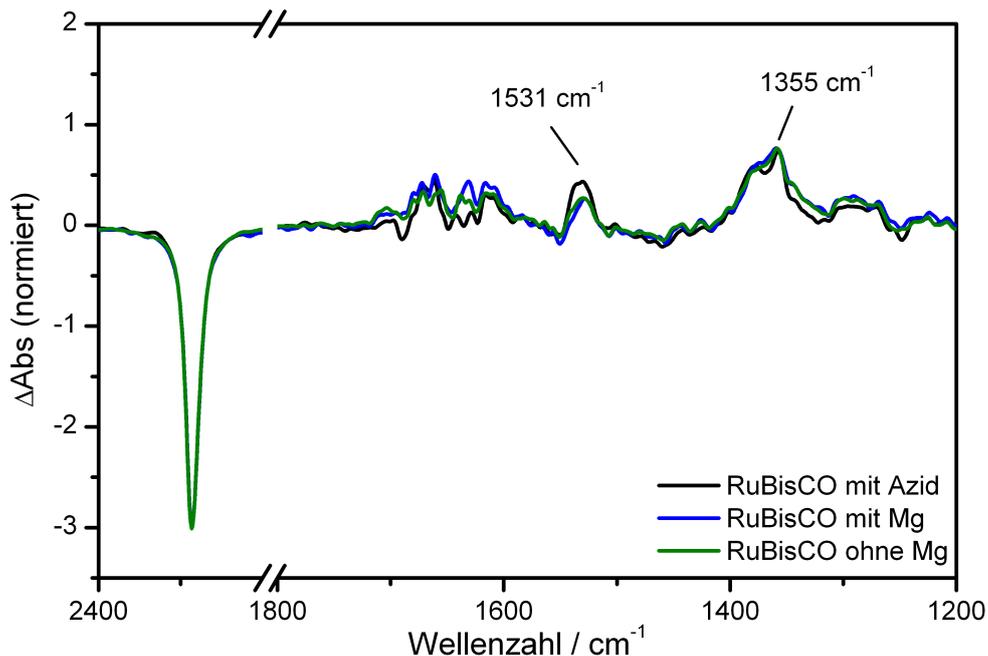


Abb. 5.46: Das Doppeldifferenzspektrum veranschaulicht den Zusammenhang aus CO_2 -Verbrauch und der Ausbildung mehrerer positiver Banden durch die Bindung des CO_2 and Lys-201. Die positiven Banden bei 1355 und 1531 cm^{-1} können der Bildung des Lysincarbamats zugeordnet werden.

Da die Käfigbanden allerdings sehr intensiv sind und die entstehenden Carbamatbanden überlagern, muss zur genaueren Interpretation der Differenzspektren ihr Einfluss aus dem Spektrum entfernt werden. Dazu wird ein Doppeldifferenzspektrum mit dem Differenzspektrum der BSA-Probe gebildet. Dadurch wird ein unspezifischer Einfluss durch eine hohe Proteinkonzentration ebenso wie die negativen Carboxylatbanden aus den Spektren entfernt. Da bekanntlich auch die Hydrolyse von CO_2 als Nebenreaktion auftreten kann, werden die Spektren auf die antisymmetrische Streckschwingung des Carboxylats bei 1566 cm^{-1} normiert. Diese Bande ist eine konstante Größe in den Differenzspektren.

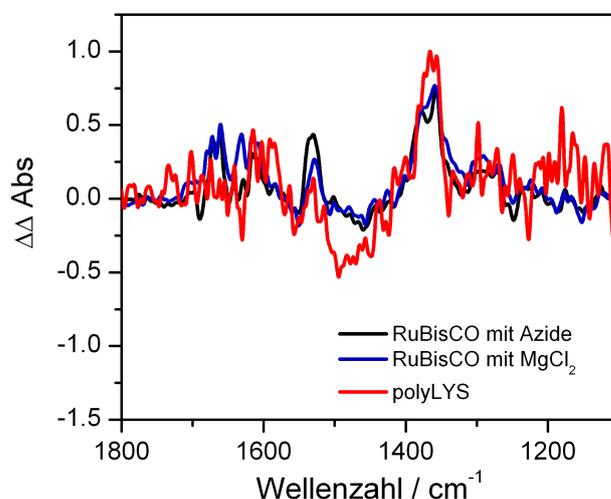


Abb. 5.47: Die Doppeldifferenzspektrum für Proben mit RuBisCO bzw. poly-Lysin im Standardpuffer mit dem BSA-Spektrum, sind zwischen 1100 und 1800 cm⁻¹ gezeigt. Weder die Anwesenheit von Magnesiumionen noch von Azidionen beeinflusst das Endprodukt der Reaktion. Die Bande bei 1355 cm⁻¹ ist ganz offensichtlich einem Lysincarbamat zu zuordnen.

Das vollständige Doppeldifferenzspektrum für die RuBisCO-Proben ist in Abbildung 5.46 gezeigt. Die negative CO₂-Bande entspricht der Menge an gebundenem CO₂, das ein Carbamat mit dem Lysin im aktiven Zentrum bildet. Die positiven Banden zwischen 1200 und 1800 cm⁻¹ sind dem Reaktionsprodukt zuzuordnen. Aus den vorangegangenen Experimenten sind zwei Details klar; zum einen führt die Berechnung eines Doppeldifferenzspektrums zweier Spektren, die jeweils nur den Käfig enthalten, nicht zu Differenzbanden im Bereich der Carboxylatbanden (vgl. 5.38). Zum anderen ist aus den Experimenten mit DEA bekannt, dass das Zwitterion eines Addukts aus tertiärem Amin und CO₂ bei 1304 cm⁻¹ eine positive Bande aufweist. Die Reaktion von RuBisCO mit CO₂ führt zu zwei ausgeprägten positiven Banden bei 1355 und 1531 cm⁻¹. Die Banden können somit nur durch die Ausbildung der C=N-Bindung im aktiven Zentrum verursacht werden.

Um die Bandenzuordnung zu überprüfen, wurde das Differenzspektrum mit dem Spektrum des Experiments mit poly-Lysin verglichen. Dieses Peptid kann mit gelöstem CO₂ nur durch die Ausbildung eines Lysincaramats reagieren. Im Gegensatz zu BSA kann das Peptid, wenn auch langsam, mit CO₂ reagieren, da die große Anzahl

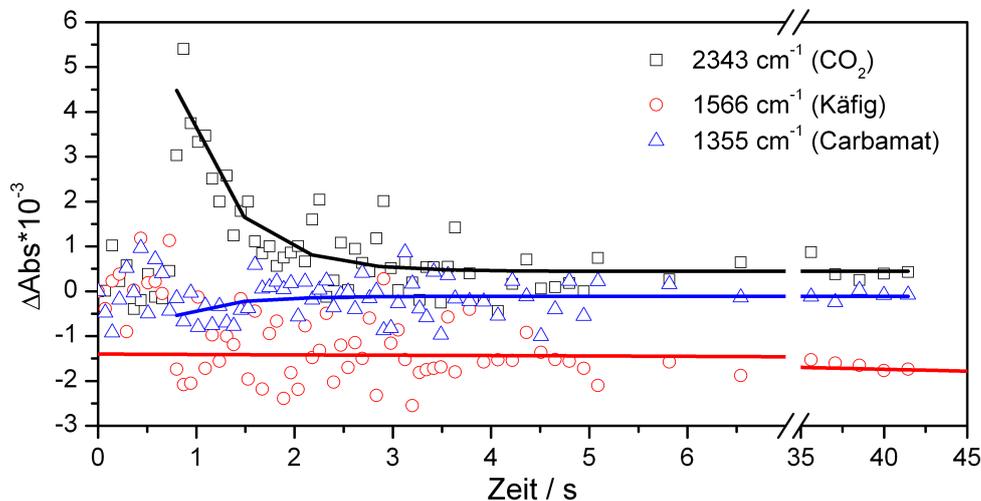


Abb. 5.48: Kinetiken bei 2343 cm^{-1} (CO₂), 1566 cm^{-1} (Käfig) und 1355 cm^{-1} (Carbamat) aus einer Rapid-Scan-Messung mit Carboanhydraseinhibitor um alle Einflüsse von Verunreinigungen auszuschließen. Die Zeitkonstanten für die exponentiellen Funktionen 1. Ordnung sind 0.57 ± 0.07 für CO₂ und -0.52 ± 0.45 für das Carbamat. Die Differenzbande des Käfigs entspricht nahezu einer Konstanten ($y = ax + b$; $a = -8,5 \cdot 10^{-6}$).

an Lysinen zusammen mit der guten Zugänglichkeit das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Carbamat verschiebt.

Auch für die poly-Lysin Probe wurde wieder ein Doppeldifferenzspektrum gebildet, um die Carboxylatbanden aus dem Spektrum zu entfernen. In Abbildung 5.47 sind die Spektren für poly-Lysin und RuBisco im Vergleich gezeigt. Auch die Reaktion von poly-Lysin führt zu den beobachtbaren positiven Banden bei ~ 1355 und 1531 cm^{-1} . Diese beiden Banden sind somit charakteristisch für ein Lysincarbamat und zeigen in den RuBisCO Messungen ganz klar die Aktivierung des Enzyms.

Mit der endgültigen Zuordnung der Banden in den Differenzspektren wird es ebenfalls möglich, die Kinetiken des CO₂-Abbaus und der Carbamatbildung zu vergleichen. Als Markerbanden werden für CO₂ 2343 cm^{-1} , für den Käfig 1566 cm^{-1} und für das Carbamat 1358 cm^{-1} verwendet. Alle drei Kinetiken stammen wieder aus Rapid-Scan-Messungen im Standardpuffer bei pH 7,5. Es lassen sich aus den Kinetiken zwei klare Aussagen treffen (die Transienten der Markerbande sind in Abbildung 5.48). Zum einen ist die Feststellung auch hier wieder zutreffend, dass die Käfigbanden in den zeitabhängigen Messungen konstant sind. Die Käfigbande lässt sich na-

hezu durch eine Konstante beschreiben. Die beiden Zeitkonstanten für den Abbau von CO₂ und die Bildung des Carbamats sind im Rahmen der Fehlergrenzen identisch ($t=0.57\pm 0.07$ s für CO₂ und $t=0.52\pm 0.45$ s für Carbamat) und können durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Der große Fehler der Carbamatbande kommt durch die Überlagerung der Bande mit den beiden negativen Banden der symmetrischen Streckschwingung der Carboxyl- und Nitrogruppe zustande.

5.2.4 Diskussion

Der erste wichtige Schritt zur Verwendung einer Käfigverbindung zusammen mit der Rapid-Scan IR-Spektroskopie ist die vollständige Charakterisierung der Verbindung und ihrer IR-Banden. Die vorgestellten Daten lassen keinen Zweifel daran, dass aus *m*-NPAA instantan $\text{CO}_2(\text{aq})$ freigesetzt werden kann (~ 200 ps), das dann als Reaktionspartner für Carboxylierungsreaktionen zur Verfügung steht. Allerdings muss dabei stets der pH-Wert und der damit verbundene Grad der CO_2 -Hydrolyse im Auge behalten werden. Die Differenzbanden durch die Abspaltung der Carboxylatgruppe sind ausgeprägt ($(-)$ 1566, 1529, 1385 und 1357 cm^{-1}). Sie bilden allerdings einen konstanten Beitrag in den Differenzspektren und können durch Doppeldifferenzbildung entfernt werden. Zusätzlich muss die Konzentration der Käfigverbindung im mM-Bereich bleiben, da höhere Konzentrationen so viel CO_2 bilden, dass in der Probe Gasblasen entstehen. Auch eine hohe Konzentration von Nitrotoluol in der Probe führt zu einer 2-Phasen-Bildung.

Experimente mit Carboanhydrase zeigen sehr anschaulich, dass die CO_2 -Bande trotz des Einflusses der spontanen Hydrolyse als Marker für die Beobachtung einer Enzymreaktion dienen kann. Daher kann das System auch zur Studie der Aktivierung von RuBisCO verwendet werden. Die zentralen Ergebnisse der Messungen zeigen, dass es eine spezifische Reaktion von RuBisCO mit CO_2 gibt, die weder durch eine Verunreinigung mit Carboanhydrase noch durch eine unspezifische Reaktion mit Aminosäureseitenketten hervorgerufen werden kann. Auch der Puffer selbst zeigt keine Reaktion mit dem gelösten CO_2 , die für die beobachteten Banden verantwortlich sein könnte. Damit steht fest, dass sich die direkte Aktivierung von RuBisCO in den Spektren beobachten lässt. Interessant ist vor allem, dass die Ergebnisse auch aus der Kristallstrukturanalyse bekannte Ergebnisse bestätigen. Laut Strukturuntersuchungen wird durch die Bindung des CO_2 -Moleküls die Sekundärstruktur des Proteins nicht oder nur marginal beeinflusst. Dies zeigen auch die IR-Spektren, in denen Beiträge des Peptidrückgrats nicht beobachtet werden können.

Die Ergebnisse der Messungen in An- und Abwesenheit von Mg^{2+} zeigen, dass die Koordination der zweiwertigen Kationen nicht notwendig ist, um das Gleichgewicht für die Carbamatbildung auf Seiten des Carbamats zu bringen. Allerdings bleibt es weiterhin unbestritten, dass für die Koordination des Substrats und somit die weiteren Reaktionsschritte im Katalysezyklus von RuBisCO die Anwesenheit von Mg^{2+} notwendig ist. Im übrigen zeigen die Messungen, dass die Bildung des Lysincarba-

rats sehr schnell (<1 s) verläuft. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Natriumazid in den Proben die Aktivierung von RuBisCO verlangsamt. Das zu CO₂ isoelektrische Anion blockiert wahrscheinlich die Bindungsstelle des CO₂, kann aber nicht kovalent gebunden werden und wird daher langsam von CO₂ verdrängt.

6 Ausblick

Die diskutierten Arbeiten zum Photozyklus von PR und zur Aktivierung von RuBisCO bilden in sich abgeschlossene Bereiche mit spannenden Ergebnissen. Allerdings werfen auch diese beiden Projekte neue Fragen auf, die weitere Forschung nötig machen.

Der Photozyklus von PR bei pH 5,1 konnte erstmals auch in Form von IR-Differenzspektren aufgeklärt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass neben Asp-97 auch Glu-108 eine Schlüsselrolle spielt, allerdings sind weitere wichtige Aminosäuren, die an dem Photozyklus beteiligt sind, noch nicht endgültig identifiziert. In nächsten Schritt müssen also Studien mit PR-Mutanten der verschiedenen Asp- und Glu-Seitenketten unter den selben Bedingungen wie für den Wildtyp durchgeführt werden. Ein interessanter Nebenaspekt ist die gezielte Suche nach den aromatischen Aminosäuren, die für die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren in den gut strukturierten PR2D-Kristallen sorgen. Auch hier können am besten einzelne AS mutiert werden, um in den CD-Spektren eine Veränderung zu beobachten.

Für die Kombination von Käfig-CO₂ mit IR-Spektroskopie ergeben sich eine Vielzahl an Perspektiven. Eine wichtige und sicherlich naheliegende ist die Verwendung eines ¹³C-markierten *m*-NPAA, um gezielt die Inkorporation der isotoopenmarkierten CO₂-Gruppe zu beobachten. Die Synthese selbst ist bereits beschrieben [116] und die Verbindung ist gut zugänglich. Mit der Markierung lassen sich dann die Bandenzuordnungen überprüfen und der Einfluss von CO₂ aus der Umgebung kann ausgeschlossen werden.

Zusätzlich lässt sich die Herangehensweise aus den RuBisCO-Studien auf weitere Enzyme übertragen, die Carboxylierungsreaktionen katalysieren. Gerade die Untersuchung von biotinabhängigen Carboxylasen bietet hier ein breites Anwendungsgebiet mit vielen offenen Fragen.

Literaturverzeichnis

- [1] Spudich, J. L., Yang, C.-S., Jung, K.-H., Spudich, E. N. (2000) Retinylidene Proteins: Structures and Functions from Archaea to Humans. *Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 16, 365–392.
- [2] Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M., Henderson, R. (1996) Electron crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 259, 393–421.
- [3] Kunji, E. R. S., von Gronau, S., Oesterhelt, D., Henderson, R. (2000) The three-dimensional structure of halorhodopsin to 5 Å by electron crystallography: A new unbending procedure for two-dimensional crystals by using a global reference structure. *PNAS* 97(9), 4637–4642.
- [4] Kolbe, M., Besir, H., Essen, L.-O., Oesterhelt, D. (2000) Structure of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin at 1.8 Å Resolution. *Science* 288(5470), 1390–1396.
- [5] Lücke, H., Schobert, B., Lanyi, J. K., Spudich, E. N., Spudich, J. L. (2001) Crystal Structure of Sensory Rhodopsin II at 2.4 Å: Insights into Color Tuning and Transducer Interaction. *Science* 293(5534), 1499–1503.
- [6] Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M. (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289(5480), 739–745.
- [7] Helmreich, E. J., Hofmann, K. P. (1996) Structure and function of proteins in G-protein coupled signal transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 285–322.
- [8] Hulme, E. C., Lu, Z. L., Ward, S. D., Allman, K., Curtis, C. A. (1999) The conformational switch in 7-transmembrane receptors: the muscarinic receptor paradigm. *Eur. J. Pharmacol.* 375, 247–260.
- [9] Lüdeke, S., Beck, M., Yan, E. C. Y., Sakmar, T. P., Siebert, F., Vogel, R. (2005) The Role of Glu181 in the Photoactivation of Rhodopsin. *Journal of Molecular Biology* 353(2), 345–356.
- [10] Stoeckenius, W. (1999) Bacterial rhodopsins: Evolution of a mechanistic model for the ion pump. *Protein Science* 8, 447–459.
- [11] Lücke, H., Schobert, B., Cartailier, J. P., Richter, H. T., Rosengarth, A., Needleman, R., Lanyi, J. K. (2000) Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 300, 1237–1255.
- [12] Lanyi, J. K., Schobert, B. (2004) Local-Global conformational Coupling in a Heptahelical Membrane Protein: Transport Mechanism from Crystal Structures of the Nine States in the Bacteriorhodopsin Photocycle. *Biochemistry* 43, 3–8.
- [13] Abramczyk, H. (2004) Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin and its retinal modified analogs: Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Chem. Phys.* 120(23), 11120–11132.

- [14] **Garczarek, F., Brown, L., Lanyi, J. K., Gerwert, K.** (2005) Proton binding within a membrane protein by a protonated water cluster. *PNAS* 102(10), 3633–3638.
- [15] **Beja, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., Jovanovich, S., Gates, C. M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Spudich, E. N., DeLong, E. F.** (2000) Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science* 289(5486), 1902.
- [16] **Beja, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Leclerc, M., DeLong, E. F.** (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411, 786–789.
- [17] **Man, D. L., Wang, W. W., Sabehi, G., Aravind, L., Post, A. F., Massana, R., Spudich, E. N., Spudich, L. J., Beja, O.** (2003) Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *Embo Journal* 22, 1725–1731.
- [18] **Man-Aharonovich, D., Sabehi, G., Sineshchekov, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L.** (2004) Characterization of RS29, a blue-green proteorhodopsin variant from the Red Sea. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 459–462.
- [19] **Sabehi, G., Massana, R., Bielawski, J. P., Rosenberg, M., DeLong, E. F., Beja, O.** (2003) Novel Proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas. *Environmental Microbiology* 5, 842–849.
- [20] **Wang, W. W., Sineshchekov, O. A., Spudich, E. N., Spudich, J. L.** (2003) Spectroscopic and Photochemical Characterization of a Deep Ocean Proteorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 278(36), 33985–33991.
- [21] **Sharma, A. K., Spudich, J. L., Doolittle, W. F.** (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends in Microbiology* 14, 463–469.
- [22] **Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizhov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M., Bamberg, E.** (2002) Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality. *J. Mol. Biol.* 321, 821–838.
- [23] **Klyszejko, A. L., Shastri, S., Mari, S. A., Grubmüller, H., Müller, D. J., Glaubitz, C.** (2008) Folding and Assembly of Proteorhodopsin. *Journal of Molecular Biology* 376, 35–41.
- [24] **Shastri, S., Vonck, J., Pflieger, N., Haase, W., Kühlbrandt, W., Glaubitz, C.** (2007) Proteorhodopsin: Characterisation of 2D crystals by electron microscopy and solid state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(12), 3012–3019.
- [25] **Baudry, J., Tajkhorshid, E., Molnar, F., Phillips, J., Schulten, K.** (2001) Molecular dynamics study of bacteriorhodopsin and the purple membrane. *J. Phys. Chem. B.* 105, 905–918.
- [26] **Rangarajan, R., Galan, J. F., Whited, G., Birge, R. R.** (2007) Mechanism of Spectral Tuning in Green-Absorbing Proteorhodopsin. *Biochemistry* 46(44), 12679–12686.
- [27] **Dioumaev, A. K., Wang, J. M., Balint, Z., Varo, G., Lanyi, J. K.** (2003) Proton Transport by Proteorhodopsin Requires that the Retinal Schiff Base Counterion Asp-97 Be Anionic. *Biochemistry* 42(21), 6582–6587.
- [28] **Dioumaev, A. K., Brown, L. S., Shih, J., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Lanyi, J. K.** (2002) Proton Transfers in the Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin. *Biochemistry* 41(17), 5348–5358.

- [29] Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizov, I., Engelhard, M., Bamberg, E. (2002) Proteorhodopsin a bR homolog from marine bacteria acts as a light-driven, bidirectional proton pump. *Biophysical Journal* 82, 1107.
- [30] Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Govindjee, R., Ebrey, T. G. (1996) Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release. *Biophys. J.* 70(1), 473–481.
- [31] Lücke, H., Schobert, B., Stagno, J., Imasheva, E. S., Wang, J. M., Balashov, S. P., Lanyi, J. K. (2008) Crystallographic structure of xanthorhodopsin, the light-driven proton pump with a dual chromophore. *PNAS* 105(48), 16561–16565.
- [32] Clayton, T., Byrne, R. H. (1993) Spectrophotometric seawater pH measurements: total hydrogen ion concentration scale calibration of m-cresol purple and at-sea results. *Deep-Sea Res.* 40, 2115–2129.
- [33] Friedrich, T., Geibel, S., Kalmbach, R., Chizov, I., Ataka, K., Heberle, J., Engelhard, M., Bamberg, E. (2002) Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality. *J. Mol. Biol.* 321, 821–838.
- [34] Lakatos, M., Varo, G. (2004) The influence of water on the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low and high pH. *J. Photochem Photobiol B.* 73(3), 177–182.
- [35] Lakatos, M., Lanyi, J. K., Szakacs, J., Varo, G. (2003) The photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low pH. *Biophys. J.* 84(5), 3252–3256.
- [36] Varo, G., Brown, L. S., Lakatos, M., Lanyi, J. K. (2003) Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. *Biophys. J.* 84(2), 1202–1207.
- [37] Spreitzer, R. J., Salvucci, M. E. (2002) RuBisCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 449–475.
- [38] Cleland, W. W., Andrews, T. J., Gutteridge, S., Hartman, F. C., Lorimer, G. H. (1998) Mechanism of Rubisco: the Carbamate as General Base. *Chem. Rev.* 98, 549–561.
- [39] Ellis, R. J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* 4, 241–244.
- [40] Hartman, F. C., Harpel, M. R. (1994) Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 197–234.
- [41] Spreitzer, R. J. (1993) Genetic dissection of Rubisco structure and function. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 411–434.
- [42] Knight, S., Andersson, I., Branden, C.-I. (1990) Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution: Subunit interactions and active site. *J. Mol. Biol.* 215, 113–160.
- [43] Schreuder, H. A., Knight, S., Curmi, P. M. G., Andersson, I., Cascio, D. (1993) Crystal structure of activated tobacco rubisco complexed with the ractin intermediate analogue 2-carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate. *Protein Sci.* 2, 1136–1146.
- [44] Taylor, T. C., Andersson, I. (1996) Structural transitions during activation and ligand binding in hexadecameric Rubisco inferred from the crystal structure of the activated unliganded spinach enzyme. *Nat. Struct. Biol.* 3, 95–101.

- [45] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (2002) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme.
- [46] Barth, A., Zscherp, C. (2002) What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35(4), 369–430.
- [47] Griffiths, P. R., de Haseth, J. A. (1986) *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. John Wiley and Sons.
- [48] Cooley, J. W., Tukey, J. W. (1965) *Math. Comput.* 19, 297ff.
- [49] Mertz, L. (1967) Auxiliary computation for Fourier spectrometry. *Infrared Phys.* 7, 17–23.
- [50] Lal, R. B., Batra, A. K. (1993) Growth and properties of triglycine sulfate (TGS) crystals: Review. *Ferroelectrics* 142(1), 51–82.
- [51] Foyt, A. G., Harman, T. C., Donnelly, J. P. (1971) Type conversion and n-p junction formation in $\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$ produced by proton bombardment. *Applied Physics Letters* 18(8), 321–324.
- [52] Goos, F., Hänchen, H. (1947) Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion. *Ann. der Phys.* 436(7), 333–346.
- [53] Hauser, M., Oelichmann, J. (1988) A Critical comparison of Solid Sample Preparation Techniques in Infrared Spectroscopy. *Mikrochim. Acta* 1, 39–43.
- [54] Forato, L. A., Bernardes-Filho, R., Colnago, L. A. (1998) Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 259, 136–141.
- [55] Johnson, T. J., Simon, A., Weil, J. M., Harris, G. W. (1993) Applications of Time-Resolved Step-Scan and Rapid-Scan FT-IR Spectroscopy: Dynamics from Ten Seconds to Ten Nanoseconds. *Applied Spectroscopy* 47(9), 1376–1381.
- [56] Causgrove, T. P., Dyer, R. B. (1993) Protein Response to Photodissociation of CO from Carbonmonoxymyoglobin Probed by Time-Resolved Infrared spectroscopy of the Amide I Band. *Biochemistry* 32, 11985–11991.
- [57] Slayton, R. M., Anfinrud, P. A. (1997) Time-resolved mid-infrared spectroscopy: methods and biological applications. *Current Opinion in Structural Biology* 7, 717–721.
- [58] Neumann, K., Verhoefen, M.-K., Weber, I., Glaubitz, C., Wachtveitl, J. (2008) Initial Reaction Dynamics of Proteorhodopsin Observed by Femtosecond Infrared and Visible Spectroscopy. *Biophys. J.* 94(12), 4796–4807.
- [59] Uhmann, W. U., Becker, A., Taran, C., Siebert, F. (1991) Time-Resolved FT-IR Absorption Spectroscopy Using a Step-Scan Interferometer. *Applied Spectroscopy* 45(3), 390–397.
- [60] Rödig, C., Siebert, F. (1999) Errors and Artifacts in Time-Resolved Step-Scan FT-IR Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 53(8), 893–901.
- [61] Weidlich, O., Siebert, F. (1993) Time-Resolved Step-Scan FT-IR Investigations of the Transition from KL to L in the Bacteriorhodopsin Photocycle: Identification of Chromophore Twists by Assigning Hydrogen-Out-Of-Plane (HOOP) Bending Vibrations. *Applied Spectroscopy* 47(9), 1394–1400.
- [62] Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica Biophysica Acta* 1767, 1073–1101.

- [63] **Siebert, F.** (1995) Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems. *Methods Enzymol.* 246, 501–526.
- [64] **Fabian, H., Mäntele, W.** (2002) *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, chapter Infrared spectroscopy of proteins, 3399–3426. John Wiley Sons, Winchester.
- [65] **Mäntele, W.** (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *TIBS* 18, 197–202.
- [66] **Abe, Y., Krimm, S.** (1972) Normal vibrations of crystalline polyglycine I. *Biopolymers* 11, 1817–1839.
- [67] **Nevskaya, N. A., Chirgadze, Y. N.** (1976) Infrared spectra and resonance interactions of amide-I and II vibrations of α -helix. *Biopolymers* 15, 637–648.
- [68] **Chirgadze, Y. N., Nevskaya, N. A.** (1976) Infrared spectra and resonance interactions of amide-I vibration of the parallel-chain pleated sheet. *Biopolymers* 15, 627–636.
- [69] **Schweitzer-Stenner, R.** (2006) Advances in vibrational spectroscopy as a sensitive probe of peptide and protein structure. A critical review. *Vibr. Spectrosc.* 42, 98–117.
- [70] **Susi, H., Byler, D. M.** (1987) FTIR study of proteins with parallel β chains. *Arch. Biochem. Biophys.* 258, 465–469.
- [71] **Byler, D. M., Susi, H.** (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469–487.
- [72] **Fabian, H., Naumann, D.** (2004) Methods to study protein folding by stopped-flow FT-IR. *Methods* 34, 28–40.
- [73] **Barth, A., Hauser, K., Mäntele, W., Corrie, J. E. T., Trentham, D. R.** (1995) Photochemical release of ATP from "caged ATP" studied by time-resolved infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10311–10316.
- [74] (2005) *Phototriggers, Photoswitches and Caged Compounds*, chapter Time-resolved infrared spectroscopy with caged compounds. An introduction. Wiley-VCH.
- [75] **Corrie, J. E. T., Ranjit, V., Munasinghe, N., Trentham, D. R., Barth, A.** (2008) Studies of decarboxylation in photolysis of α -carboxy-2-nitrobenzyl (CNB) caged compounds. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 84–97.
- [76] **Barth, A., Kreutz, W., Mäntele, W.** (1990) Molecular changes in the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase during catalytic activity. *FEBS* 277(1), 147–150.
- [77] **Barth, A., Mäntele, W., Kreutz, W.** (1991) Infrared spectroscopic signals arising from ligand binding and conformational changes in the catalytic cycle of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase. *BBA* 1057, 115–123.
- [78] **Görne-Tschelnokow, T., Hucho, F., Naumann, D., Barth, A., Mäntele, W.** (1992) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic investigation of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). *FEBS* 309(2), 213–217.
- [79] **Mäntele, W.** (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *TIBS* 18, 197–202.

- [80] Pelliccioli, A. P., Wirz, J. (2002) Photoremovable protection groups: reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 441–458.
- [81] Kelly, S. M., Jess, T. J., Rice, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1751, 119–139.
- [82] Johnson, W. C. (1988) Secondary Structure of Proteins through Circular Dichroism Spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17, 145–166.
- [83] Sreerama, N., Woody, R. W. (2009) On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Science* 13(1), 100–112.
- [84] Pflieger, N., Lorch, M., Wörner, A., Shastri, S., Glaubitz, C. (2008) Characterisation of Schiff base and chromophore in green proteorhodopsin by solid-state NMR. *J. Biomol. NMR* 40, 15–21.
- [85] Salvucci, M. E., Portis, A. R., Ogren, W. L. (1986) Purification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase with high specific activity by fast protein liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 153(1), 97–101.
- [86] Dzafic, E., Klein, O., Goswami, P., Kühlbrand, W., Mäntele, W. (2009) Infrared spectroscopic study of the structural and functional properties of the Na⁺/H⁺ antiporter MjNhaP1 from *Methanococcus jannaschii*. *BBA - Bioenergetics* 1787(6), 730–737.
- [87] Kelemen, B. R., Du, M., Jensen, R. B. (2003) Proteorhodopsin in living color: diversity of spectral properties within living bacterial cells. *BBA* 1618, 25–32.
- [88] Vogel, R., Ruprecht, J., Villa, C., Mielke, T., Schertler, G. F. X., Siebert, F. (2004) Rhodopsin Photoproducts in 2D Crystals. *Journal of Molecular Biology* 338(3), 597–609.
- [89] Neumann, K., Verhoefen, M.-K., Weber, I., Glaubitz, C., Wachtveitl, J. (2008) Initial Reaction Dynamics of Proteorhodopsin Observed by Femtosecond Infrared and Visible Spectroscopy. *Biophys. J.* 94, 4796–4807.
- [90] Bergo, V., Amsden, J. J., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Rothschild, K. J. (2004) Structural changes in the photoactive site of proteorhodopsin during the primary photoreaction. *Biochemistry* 43, 9075–9083.
- [91] Furutani, Y., Ikeda, D., Shibata, M., Kandori, H. (2006) Characterization of the Primary Photochemistry of Proteorhodopsin with Femtosecond Spectroscopy. *Chem. Phys.* 324, 705–708.
- [92] Xiao, Y. W., Partha, R., Krebs, R., Braiman, M. (2005) Time-Resolved FTIR Spectroscopy of the Photointermediates Involved in Fast Transient H⁺ Release by Proteorhodopsin. *J. Phys. Chem. B* 109, 634–641.
- [93] Braiman, M. S., Mogi, T., Marti, T., Stern, L. J., Khorana, H. G. (1988) Vibrational Spectroscopy of Bacteriorhodopsin Mutants. Light-driven Proton Transport Involves Protonation Changes of Aspartic Acid Residues 85, 96, and 212. *Biochemistry* 27, 8516–8520.
- [94] Gerwert, K., Hess, B., Soppa, J., Oesterhelt, D. (1989) The role of Asp 96 in the proton pump mechanism of bacteriorhodopsin. *PNAS* 86, 4943–4947.
- [95] Heyes, C. D., El-Sayed, M. A. (2002) The Role of the Native Lipids and Lattice Structure in Bacteriorhodopsin Protein Conformation and Stability as Studied by Temperature-dependent Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 277, 29437–29443.

- [96] **Varo, G., Lanyi, J. K.** (1991) Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration. *Biophys. J.* 59, 313–322.
- [97] **Zscherp, C., Heberle, J.** (1997) Infrared Difference Spectra of the Intermediates L, M, N, and O of the Bacteriorhodopsin Photoreaction Obtained by Time-Resolved Attenuated Total Reflection Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 101, 10542–10547.
- [98] **Lörinczi, E., Verhoefen, M.-K., Wachtveitl, J., Woerner, A. C., Glaubitz, C., Engelhard, M., Bamberg, E., Friedrich, T.** (2009) Voltage- and pH-dependent Changes in Vectoriality of Photocurrents Mediated by Wild-type and Mutant Proteorhodopsins upon Expression in *Xenopus* Oocytes. *submitted*.
- [99] **Nagel, G., Mockel, B., Büldt, G., Bamberg, E.** (1995) Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS Lett.* 377, 263–266.
- [100] **Ormos, P., Dancshazy, Z., Keszthelyi, L.** (1980) Electric response of a back photoreaction in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* 31, 207–213.
- [101] **Pillai, V. P. M., Pradeep, T., Bushiri, M. J., Jayasree, R. S., Nayar, V. U.** (1997) Vibrational spectroscopic studies of FeClMoO₄, Na₂MoO₄ and Na₂MoO₄·2H₂O/D₂O. *Spectrochim. Acta Part A* 53, 867–876.
- [102] **Hessling, B., Souvignier, G., Gerwert, K.** (1993) A model-independent approach to assigning bacteriorhodopsin's intramolecular reactions to photocycle intermediates. *Biophys. J.* 65, 1929–1941.
- [103] **Margerum, D. J., Petrusis, C. T.** (1969) The Photodecarboxylation of Nitrophenylacetate Ions. *J. Am. Chem. Soc.* 91(10), 2467–2472.
- [104] **Shirai, W., Moriya, K., Kawazoa, Y.** (1986) pH Dependence of hydrolytic removal of silyl group from trialkylsilyl ethers. *Tetrahedron* 42(8), 2211–2214.
- [105] **Chandrasekar, R., Venkatasubramanian, N.** (1982) Alkaline Hydrolysis of Aryl Phenylacetates and Aryl 4-Nitrophenylacetates. Evidence consistent with an Elimination-Addition Mechanism. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1, 1625–1631.
- [106] **Barth, A., Martin, S. R., Corrie, J. E. T.** (2006) Decarboxylation is a significant reaction pathway for photolabile calcium chelators and related compounds. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 107–115.
- [107] **Corrie, J. E. T., Munasinghe, V. R. N., Trentham, D. R., Barth, A.** (2008) Studies of decarboxylation in photolysis of α -carboxy-2-nitrobenzyl (CNBC) caged compounds. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 84–97.
- [108] (1990) *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Academic Press Inc.
- [109] **Millero, F., Huang, F., Graham, T., Pierrot, D.** (2007) The dissociation of carbonic acid in NaCl solutions as a function of concentration and temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 46–55.
- [110] **Harned, H. S., Davis, R.** (1943) The Ionization constant of Carbonic Acid in Water and the solubility of Carbon Dioxide in Water and Aqueous Salt Solutions from 0 to 50°. *J. Am. Chem. Soc.* 65(10), 2030–2037.

- [111] **Khalifah, R. G.** (1971) The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase. *J. Biol. Chem.* 246(8), 2561–2573.
- [112] **Juelin, L., Henni, A., Tontiwachwuthikul, P.** (2007) Reaction Kinetics of CO₂ in Aqueous Ethylenediamine, Ethyl Ethanolamine, and Diethyl Monoethanolamine solutions in the Temperature Range of 298–313 K, Using the Stopped-Flow Technique. *Ind. Eng. Chem. Res.* 4426–4434.
- [113] **Hokins, B.** (1977) Studies on the mechanism of action of acetazolamide in the prophylaxis of hyperkalemic periodic paralysis. *Life Sci.* 20, 343–350.
- [114] **Fawcett, T. W., Browse, J. A., Volokita, M., Bartlett, S. G.** (1990) Spinach Carbonic Anhydrase Primary Structure Deduced from the Sequence of a cDNA Clone. *J. Biol. Chem.* 265(10), 5414–5417.
- [115] (1988) *Synthetic polypeptides as antigens*. Elsevier.
- [116] **Corrie, J. E. T., Munasinghe, V. R. N.** (2005) Preparation of [carboxy-¹³C]4-nitrophenylacetic acid. *J. Label Compd. Radiopharm.* 48, 231–233.

Abbildungsverzeichnis

3.1	Retinal	13
3.2	Kristallstruktur von BR, HR, XR und Rhodopsin	14
3.3	Rhodopsin dunkeladaptiert	15
3.4	BR Photozyklus	17
3.5	Phylogenetischer Baum	18
3.6	PR Homologiemodell	19
3.7	PR Photozyklus nach [33]	21
3.8	Röntgenkristallstruktur RuBisCO	22
3.9	Reaktion von RuBisCO mit seinem Substrat	23
3.10	RuBisCO Mechanismus	25
3.11	Lambert-Beer-Gesetz	27
3.12	Michelson-Interferometer	30
3.13	Probenhalter für IR-Messungen	33
3.14	StepScan Prinzip	34
3.15	IR-Spektrum der Sekundärstrukturelemente (Amid I)	37
3.16	Nitrophenylkäfig	39
3.17	Prinzip der CD-Spektroskopie	42
3.18	CD-Spektrum eines α -helikalen Proteins	42
4.1	Grabenküvette	50
4.2	exemplarisches IR-Differenzspektrum	52
4.3	Kryostat	54
4.4	Schema des Messaufbaus für die Tieftemperaturspektren	54
5.1	VIS-Spektrum PR bei pH 5,5 und 8,5	58
5.2	IR-Absorptionsspektrum von PR2D und PRrek	59
5.3	CD-Spektrum von PR bei RT	61
5.4	CD-Spektrum PR im Bereich 260 bis 300 nm	62
5.5	CD-Spektrum temperaturabhängig	63
5.6	CD-Spektrum temperaturabhängige Kinetiken	64

5.7	Homologiemodell mit hervorgehobenen arom. Aminosäuren	65
5.8	FTIR-Differenzspektrum PR2D bei 77 K und pH 9	66
5.9	FTIR-Differenzspektrum PR2D Rapid Scan bei pH 9 und RT	68
5.10	Transiente Absorption bei 1536 cm^{-1}	69
5.11	Transiente Abs bei 1755 cm^{-1}	69
5.12	Kinetisch und thermodynamisch kontrollierter Photozyklus	71
5.13	K-Spektren bei pH 5,1 und 9,0	72
5.14	K-Spektren pH 5,1 und 5,5	74
5.15	K-Spektren pH 9,0 und 8,5	75
5.16	M-Spektrum pH 9,0	76
5.17	M-Spektrum bei pH 9,0	77
5.18	M-Spektrum: Transiente bei 1538 cm^{-1}	78
5.19	späte Intermediate pH 9,0	79
5.20	M-Spektrum pH 5,1	81
5.21	M- und Vis-Spektrum bei pH 5,1	83
5.22	Messung mit intrinsischem pH-Sensor	84
5.23	M-Spektrum (pH 5,1): Transiente bei 1538 cm^{-1}	85
5.24	Späte Intermediate pH 5,1	86
5.25	M-Intermediat bei pH 5,1/5,5	88
5.26	Späte Intermediate pH 5,1/5,5	89
5.27	M Intermediate pH 8,5	90
5.28	Titration im ATR	91
5.29	pH-abhängiger Mechanismus für PR	93
5.30	Mechanismus PR	97
5.31	2D Femtosekunden-IR-Spektrum	98
5.32	CO ₂ -Transiente aus der Kurzzeitmessung	98
5.33	UV/Vis-Absorptionsspektrum <i>m</i> -NPAA	100
5.34	Kurzzeit 2D	101
5.35	Zeitabhängige Spektren der Photolyse von <i>m</i> - und <i>p</i> -NPAA	102
5.36	pH-abhängige Hydrolyse von CO ₂	104
5.37	CO ₂ -Kinetik für <i>m</i> -NPAA mit und ohne Carboanhydrase	106
5.38	Differenzspektren der Puffer	107
5.39	DEA mit Käfig-CO ₂	109
5.40	poly-Lysine mit Käfig-CO ₂	110
5.41	Modell des aktiven Zentrums von RuBisCO	111
5.42	CO ₂ -Kinetik mit und ohne RuBisCO	112

5.43	Spektren mit dem Carboanhydraseinhibitor Acetazolamid	114
5.44	Aktivierung von RuBisCO (IR-Differenzspektren)	116
5.45	Transienten bei 2343 cm^{-1} für die Aktivierung von RuBisCO	117
5.46	Doppeldifferenzspektrum der Bildung des Lysincarbamats	118
5.47	Doppeldifferenzspektren von RuBisCO und poly-Lysin	119
5.48	Carbamatbildung (Transienten)	120

Lebenslauf

Persönliche Daten

Gabriela Schäfer
Hinter den Ulmen 22
60433 Frankfurt

Tel.: 069 95 10 73 33

E-Mail: schaefer@biophysik.org

Geboren am 23. Oktober 1981 in Hanau

Schulbildung

08/1987–07/1991 Grundschule I, Sarstedt

09/1991–07/2000 Bischöfliches Gymnasium Josephinum, Hildesheim
Abitur (Note 1.2)

Studium

10/2000–10/2002 Universität Heidelberg, Chemievordiplom (Note 1.2)

10/2002–03/2005 Universität Heidelberg, Chemiediplom (Note 1.2)
Schwerpunktfach: Biophysik

Diplomarbeit bei Prof. Wolfrum mit dem Thema *Einsatz von Fluoreszenz gelöschten Sonden in Kombination mit Oligonukleotiden als Diskriminatoren für den selektiven Nachweis von Punktmutationen in DNS Sequenzen*

04/2005–heute Universität Frankfurt, Promotion am Institut für Biophysik, Arbeitskreis Prof. Mäntele
Promotion mit dem Titel *Charakterisierung der Photoreaktion der lichtgetriebenen Protonenpumpe Proteorhodopsin mit IR-Spektroskopie*

und die Entwicklung einer Methodik zur Untersuchung von Carboxylierungsreaktionen am Beispiel von RuBisCO

Berufserfahrung

- 06/2000–09/2000 Besucherbetreuung/-führung EXPO 2000, ISA Consult, Hannover
- 08/2002–09/2002 Praktikum in der Polymerforschung, BASF AG, Ludwigshafen
- 01/2003–03/2004 Hilfwissenschaftler Fachbereichsbibliothek der chemischen Institute, Universität Heidelberg
- 06/2003–08/2003 Hilfwissenschaftler im Praktikum "Chemie für Mediziner", Universität Heidelberg
- 07/2003–03/2004 Konzeption Lernkarteikarten Deutsch/Mathematik für Grundschulen, NiMakk Verlag, Heidelberg, Freiberuflich
- 04/2005–heute Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysik, Universität Frankfurt

Publikationen und Konferenzbeiträge

Caged CO₂: A valuable tool for time resolved FTIR studies on carboxylation reactions and its application on RuBisCo.

G. Schäfer, W. Mäntele, G. Wille, Manuskript in Vorbereitung.

Low temperature FTIR spectroscopy reveals new insights on the pH-dependent proton pathway of Proteorhodopsin.

M.K. Verhoefen, G. Schäfer, S. Shastri, I. Weber, C. Glaubitz, W. Mäntele, J. Wachtveitl, Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht

Characterizing the Structure and Photocycle of PR 2D Crystals with CD and FTIR Spectroscopy

G. Schäfer, S. Shastri, M.-K. Verhoefen, V. Vogel, C. Glaubitz, J. Wachtveitl and W. Mäntele, Photochemistry and Photobiology, 2009, 85, 529-534.

Caged CO₂: A novel tool for time resolved FTIR studies of carboxylation reactions and its application on RuBisCo

G. Schäfer, W. Mäntele, G. Wille, JCF Frühjahrssymposium, 2009, Essen, Germany.

Low temperature FTIR difference spectroscopy reveals new insights on the proton pathway of Proteorhodopsin at different pH values

G. Schäfer, M.-K. Verhoefen, S. Shastri, I. Weber, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, W. Mäntele, EUCMOS, 2008, Opatija, Croatia.

Characterizing the structure and photocycle of Proteorhodopsin 2D crystals with CD- and FTIR-spectroscopy

G. Schäfer, S. Shastri, M.-K. Verhoefen, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, W. Mäntele, ICRP (International Conference on Retinal Proteins) 2008, Barcelona, Spain.

Time-resolved and temperature dependent FTIR studies on 2D crystals of the proton pump Proteorhodopsin

G. Schäfer, S. Shastri, C. Glaubitz and W. Mäntele, 12th ECSBM (European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules), 1.-6. September 2007, Paris, France

Self-quenching DNA-probes based on aggregation of fluorescent dyes

G. Schäfer, M. Müller, B. Häfner, G. Habl, O. Nolte, N. Marmé, J.P. Knemeyer, SPIE Proc. 2005, 5704, 30-39.

Self-quenching DNA-probes based on dye dimerization for identification of mycobacteria

J.P. Knemeyer, N. Marmé, B. Häfner, G. Habl, G. Schäfer, M. Müller, O. Nolte, M. Sauer, J. Wolfrum, Int. J. Environ. An. Ch. 2005, 85, 625-637.

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Werner Mäntele für die Betreuung meiner Dissertation, die Einführung in das spannende Feld der Infrarotspektroskopie und die stets offene Tür bei allen Problemen und Fragen ganz herzlich danken.

Für die Versorgung mit Tee, RuBisCO, brillianten Wortwitzen und beständig sprudelnden Ideen gebührt mein Dank Dr. Georg Wille. Vor allem die Einladung, mich an seinem Käfig-CO₂-Projekt zu beteiligen, hat nicht nur für viel Arbeit sondern auch für großartige Ergebnisse gesorgt - Danke Georg.

Mit Mirka Verhoefen zusammen habe ich nicht nur ungezählte Kryofenster ausgetauscht und den Kryo von seiner Eishülle befreit sondern vor allem auch die Tieftemperaturmessungen durchgeführt. Vielen Dank für die Einführung in die (Un)Tiefen des PR Photozyklus und eine großartige Freundschaft.

Prof. Clemens Glaubitz und seinen Mitarbeiterinnen Sarika Shastri, Nicole Pflieger und Ingrid Weber möchte ich für die Überlassung von unzähligen PR Proben und die Diskussionen über das PR-Projekt herzlich danken.

Mirka-Kristin Verhoefen und Karsten Neumann möchte ich zudem für die von ihnen durchgeführten Kurzzeitmessungen mit NPAA danken, die mir erst die Möglichkeit gegeben haben, meine Daten zuverlässig zu interpretieren.

Dem Dreigestirn Annette Kopitz, Jürgen Maurer und Christian (Entertaste) Weidemüller möchte ich für die vielen Lacher, das geduldige Ertragen meiner Anekdoten und Witze, die Organisation von Grillabenden, Bowlingrunden und AK-Feiern und natürlich die Unterstützung bei etlichen wissenschaftlichen Fragen danken.

Unvergessen sind und bleiben die Kollegen aus dem Büro 414, Dr. Martina Wolpert, Dr. Carsten Krejtschi, Dr. Enela Dzafic und Andreas Roth mit denen mich in den letzten Jahren wertvolle Diskussionen, Gummibärchen und die allumfassende Frage nach der Bedeutung von H₂O für die IR-Spektroskopie verbunden haben.

Mirka, Ute, Nina, Heike und Georg möchte ich für die unterhaltsamen Spieleabende danken, bei denen so manche nützliche wissenschaftliche Diskussion stattfand.

Danken möchte ich auch Ernst Winter, der immer wieder krakelige Zeichnungen und krude mündliche Beschreibungen über Nacht in funktionierende IR-Zellen und Spektrometerbauteile verwandelt hat.

Neben all den Kollegen und Freunden war vor allem meine Familie immer für mich da. Gerade an meinen Vater habe ich beim Schreiben dieser Arbeit oft gedacht. Ich möchte daher ganz besonders Mama, Rüdi, Markus, Aline, Nina und Lena Danke sagen für ihre vielfältige Unterstützung während meiner Promotion.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die aus benutzten Werken im Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, mit Quellen- bzw. Herkunftsangaben kenntlich gemacht habe.

Frankfurt, den _____
