

# Deaktivierungsdynamik von mikrobiellem und visuellem Rhodopsin

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Carl Elias Eckert**  
aus Darmstadt

Frankfurt am Main 2017  
(D30)

vom Fachbereich 14 der  
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Erstgutachter: Prof. Dr. Josef Wachtveitl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Datum der Disputation:

Für meinen Vater.

*”Le cœur a ses raisons que la  
raison ne connaît point; on le sait  
en mille choses.”*

Blaise Pascal, Pensées, 1670



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xvii
<b>1 Vorwort</b>	<b>1</b>
<b>2 Experimentelles</b>	<b>5</b>
2.1 Blitzlichtphotolyse . . . . .	5
2.1.1 Der Anregepuls . . . . .	5
2.1.2 Der Abfragepuls . . . . .	6
2.1.3 Der experimentelle Aufbau . . . . .	7
2.1.4 Synchronisation . . . . .	9
2.1.5 Datenerfassung . . . . .	11
2.2 Ultrakurzzeitspektroskopie . . . . .	11
2.2.1 Nichtlineare Optik . . . . .	12
2.2.2 Prinzip eines Kurzpulslasers . . . . .	20
2.2.3 Die Femtosekundenlaserquelle . . . . .	27
2.2.4 Der UV-Vis-Messaufbau . . . . .	29
2.2.5 Der MIR-Messaufbau . . . . .	32
2.3 Kinetische Analyse transienter Daten . . . . .	34

2.3.1	Globale Lebensdaueranalyse . . . . .	34
2.3.2	Lebensdauerdichteanalyse . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Proteorhodopsin</b>	<b>37</b>
3.1	Struktur und Funktionsweise von Proteorhodopsin . . . . .	38
3.2	Der Photozyklus von Proteorhodopsin . . . . .	40
3.3	Die Protonendonormutante E108Q . . . . .	42
3.3.1	Die frühe Photodynamik . . . . .	43
3.3.2	Abschätzung zur Quantenausbeute der K-Intermediatsbildung . . . . .	56
3.3.3	Der Photozyklus der Mutante E108Q . . . . .	57
3.3.4	Fazit . . . . .	62
3.4	Die lichtinduzierte Deaktivierungsdynamik von Proteorhodopsin . . . . .	63
3.4.1	Der BLQ-Effekt . . . . .	63
3.4.2	Die E108Q-Mutante im photostationären Zustand . . . . .	66
3.4.3	Die BLQ-Photodynamik im UV-Vis-Bereich . . . . .	68
3.4.4	Die BLQ-Photodynamik im MIR-Bereich . . . . .	73
3.4.5	Die Reprotonierung der Schiff'schen Base . . . . .	82
3.4.6	Fazit . . . . .	84
<b>4</b>	<b>Visuelles Rhodopsin</b>	<b>87</b>
4.1	GPCR . . . . .	88
4.1.1	Signaltransduktion über GPCRs . . . . .	89
4.1.2	Struktur von GPCRs . . . . .	90
4.1.3	Strukturänderungen eines aktivierten GPCR . . . . .	94
4.2	Der GPCR-Photorezeptor Rhodopsin . . . . .	95
4.2.1	Signaltransduktion von Rhodopsin . . . . .	97
4.2.2	Struktur von Rhodopsin . . . . .	99

---

4.2.3	Photodynamik von Rhodopsin . . . . .	100
4.2.4	Regenerierung des 11- <i>cis</i> -Retinals . . . . .	104
4.3	Arrestin . . . . .	104
4.3.1	Visuelles Arrestin-1 . . . . .	105
4.3.2	Die Arrestin-1-Variante p44 . . . . .	107
4.4	Einfluss des Arrestins auf den Photozerfall von Rhodopsin . .	108
4.5	Detergensabhängige Photodynamik von Rhodopsin . . . . .	117
4.6	Nachtblindheit-assoziierte Mutante G90D . . . . .	120
4.6.1	Stabilisiertes Rhodopsin . . . . .	123
4.6.2	Die stabilisierte G90D-Mutante . . . . .	129
4.6.3	Zusammenfassung . . . . .	139
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>145</b>
	<b>Eigene Publikationen</b>	<b>149</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>174</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>177</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>179</b>



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Erzeugung des ns-Anregepulses . . . . .	5
2.2	Abfragelicht der Blitzlichtphotolyse . . . . .	7
2.3	Experimenteller Aufbau der Blitzlichtphotolyse . . . . .	8
2.4	Detektor der ICCD-Kamera . . . . .	9
2.5	Frequenzdivisor in der Blitzlichtphotolyse . . . . .	10
2.6	Messschema der Blitzlichtphotolyse . . . . .	12
2.7	Brechungsindex-Ellipsoid . . . . .	17
2.8	Güteschaltung . . . . .	21
2.9	Anschwingende Moden in einem Resonator . . . . .	22
2.10	Modenkopplung . . . . .	24
2.11	Selbstphasenmodulation . . . . .	26
2.12	Aufbau eines CPA-Lasers . . . . .	28
2.13	Messaufbau der ATAS . . . . .	30
2.14	Messweise der ATAS . . . . .	31
2.15	Messaufbau der IRMA . . . . .	33
3.1	Struktur von Proteorhodopsin . . . . .	39
3.2	Photozyklus von Proteorhodopsin . . . . .	41
3.3	Absorptionsspektrum von GPR-E108Q und GPR-Wildtyp. . . . .	43
3.4	Ultrakurzzeitphotodynamik von Proteorhodopsin-E108Q im UV-Vis-Bereich . . . . .	44

---

3.5	Ultrakurzzeitdynamik der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante bei ausgesuchten Wellenlängen . . . . .	45
3.6	Ultrakurzzeitphotodynamik von Proteorhodopsin-E108Q im MIR-Bereich . . . . .	46
3.7	Ultrakurzzeitdynamik der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante bei ausgesuchten Wellenzahlen . . . . .	47
3.8	DAS der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q zwischen 1490 und 1570 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	48
3.9	DAS der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q zwischen 1540 und 1640 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	50
3.10	DAS der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q zwischen 1600 und 1700 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	53
3.11	Ultrakurzzeitphotodynamik von Proteorhodopsin-E108Q im MIR-Bereich bei blauem Anregungslicht . . . . .	54
3.12	Mit blauem Anregungslicht induzierte Ultrakurzzeitdynamik der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante bei ausgesuchten Wellenzahlen . . . . .	55
3.13	DAS der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q bei blauem Anregungslicht im MIR-Bereich . . . . .	56
3.14	Photozyklus von PR-E108Q und PR-WT . . . . .	58
3.15	Zerfallsassoziierte Spektren bezüglich des Photozyklus von PR-E108Q und PR-WT . . . . .	59
3.16	Transiente Absorptionsänderung von PR-E108Q bis 40 s . . . . .	61
3.17	GPR-E108Q und GPR-Wildtyp im photostationären Gleichgewicht . . . . .	67
3.18	Ultrakurzzeitdynamik des BLQ-Prozesses im sichtbaren Bereich . . . . .	69
3.19	Zerfallsassoziierte Spektren zu der Ultrakurzzeitmessung des BLQ-Prozesses im sichtbaren Bereich . . . . .	70
3.20	FTIR-Messung an der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante . . . . .	74

3.21	Ultrakurzzeitdynamik der photoinduzierten Deaktivierung der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante zwischen 1490-1570 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	75
3.22	Zerfallsassoziierte Spektren zu der Ultrakurzzeitmessung des BLQ-Prozesses zwischen 1490-1570 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	76
3.23	Ultrakurzzeitdynamik der photoinduzierten Deaktivierung der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante zwischen 1545-1635 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	78
3.24	Zerfallsassoziierte Spektren zu der Ultrakurzzeitmessung des BLQ-Prozesses zwischen 1545-1635 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	79
3.25	Ultrakurzzeitdynamik der photoinduzierten Deaktivierung der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante zwischen 1600-1700 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	80
3.26	Zerfallsassoziierte Spektren zu der Ultrakurzzeitmessung des BLQ-Prozesses zwischen 1600-1700 $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	81
3.27	Transienter Verlauf der Deprotonierung des D97-Restes . . . . .	83
3.28	Schema des GPR-Photozyklus und des BLQ-Prozesses . . . . .	84
4.1	Schema eines 7TM-Rezeptors . . . . .	89
4.2	Prinzip der Signaltransduktion eines 7TM-Rezeptors . . . . .	91
4.3	Interhelikale Wechselwirkungen in einem GPCR . . . . .	92
4.4	Aufbau der Retina . . . . .	96
4.5	Signaltransduktion von Rhodopsin . . . . .	97
4.6	Deaktivierung der Signaltransduktion von Rhodopsin . . . . .	98
4.7	Struktur von Rhodopsin . . . . .	100
4.8	Photozyklus von Rhodopsin . . . . .	102
4.9	Konfigurationszustand des Retinals in Rhodopsin . . . . .	103
4.10	Struktur von Arrestin-1 . . . . .	105
4.11	Schema des Proteorhodopsin-Photozyklus . . . . .	107
4.12	Transiente Absorption von Rhodopsin in DHPC . . . . .	111

---

4.13	Transiente Doppeldifferenz von Rhodopsin mit und ohne Arr-Tr	112
4.14	DAS zu der transienten Absorption von Rhodopsin mit und ohne Arr-Tr . . . . .	113
4.15	Lebensdauerdichtekarten . . . . .	114
4.16	Modell zum Einfluss von Arr-Tr auf die Photodynamik von Rhodopsin . . . . .	116
4.17	Transiente Absorption von Rhodopsin in DDM . . . . .	118
4.18	Kinetische Analyse zu der transienten Absorption von Rhodopsin solubilisiert in DDM . . . . .	119
4.19	Strukturbild von Rhodopsin von der extrazellulären Seite . .	121
4.20	Absorptionsspektren des Rhodopsinwildtyps, des stabilisierten Rhodopsins und der stabilisierten Mutante G90D . . . . .	123
4.21	Transiente Absorption des stabilisierten Rhodopsins (Doppelmutante N2C und D282C) in DDM . . . . .	124
4.22	Kinetische Analyse zu der transienten Absorption des stabilisierten Rhodopsins (Doppelmutante N2C und D282C) solubilisiert in DDM . . . . .	125
4.23	Ultraschnelle transiente Absorption von Rhodopsin (WT) in DDM . . . . .	126
4.24	Transiente Verläufe und DAS von Rhodopsin (WT) in DDM	127
4.25	Ultraschnelle transiente Absorption des stabilisierten Rhodopsins (Mutationen N2C und D282C) in DDM . . . . .	127
4.26	Transiente Verläufe und DAS vom stabilisierten Rhodopsin in DDM . . . . .	128
4.27	Transiente Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D in DDM . . . . .	132
4.28	Kinetische Analyse zu der transienten Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C, D282C) solubilisiert in DDM . . . . .	133

---

4.29	Transiente Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C beziehungsweise D282C) bis zu einer Verzögerungszeit von 1 min . . . . .	134
4.30	Ultraschnelle transiente Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C, D282C) in DDM . . . . .	136
4.31	Transiente Verläufe und DAS von der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C, D282C) in DDM . . . . .	137
4.32	Kinetische Modelle vom Rhodopsin WT, vom stabilisierten Rhodopsin und von der stabilisierten G90D-Mutante . . . . .	140



# Tabellenverzeichnis

2.1	Auffistung der Messsignale der ATAS . . . . .	32
3.1	Auffistung spektroskopisch charakteristischer Zahlenwerte verschiedener Intermediate von Proteorhodopsin . . . . .	77
4.1	Auffistung der LDM-Signaturen . . . . .	115



# Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMD	Adenosinmonophosphat
APM	Additive Pulsmodenkopplung
Arr-Tr	Arrestin Variante Arr1-378
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintri-phosphat
ATAS	<i>Advanced Transient Absorption Spectroscopy</i>
BBO	$\beta$ -BaB <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
BLQ	<i>Blue Light Quenching</i>
BLM	<i>Black Lipid Membrane</i>
BPR	Blau absorbierendes Proteorhodopsin
BR	Bakteriorhodopsin
BSI	<i>Blue Shift Intermediate</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
cGMP	<i>Cyclic Guanosinmonophosphate</i>
CPA	<i>Chirped Pulse Amplification</i>
DAS	<i>Decay Associated Spectra</i>
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid
DFG	<i>Difference Frequency Generation</i>
DHPC	1,2-Diheptanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
ECL	<i>Extracellular Loop</i>
ESA	<i>Excited State Absorption</i>
FSR	<i>Free Spectral Range</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared</i>
GLA	<i>Global Lifetime Analysis</i>
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin

<b>GMP</b>	.....	Guanosinmonophosphat
<b>GPCR</b>	.....	<i>G-Protein Coupled Receptor</i>
<b>GPR</b>	.....	Grün absorbierendes Proteorhodopsin
<b>GRK</b>	.....	GPCR-Rhodopsin-Kinase
<b>GSB</b>	.....	<i>Ground-State Bleach</i>
<b>GTP</b>	.....	Guanosintriphosphat
<b>HOOP</b>	.....	<i>Hydrogen-Out-Of-Plane</i>
<b>ICCD</b>	.....	<i>Intensified Charge-Coupled Device</i>
<b>ICL</b>	.....	<i>Intracellular Loop</i>
<b>IST(-Modell)</b>	.....	<i>Isomerization-Switch-Transfer(-Modell)</i>
<b>KSNB</b>	.....	Kongenitale Stationäre Nachtblindheit
<b>KTP</b>	.....	Kaliumtitanylphosphat
<b>LBO</b>	.....	Lithiumtriborat
<b>LBT</b>	.....	Ligandenbindetasche
<b>LDA</b>	.....	<i>Lifetime Density Analysis</i>
<b>LDM</b>	.....	<i>Lifetime Density Map</i>
<b>LED</b>	.....	<i>Light-Emitting Diode</i>
<b>Lle</b>	.....	Isoleucin
<b>LRAT</b>	.....	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
<b>LT</b>	.....	<i>Low Temperature</i>
<b>Lys</b>	.....	Lysin
<b>MCT</b>	.....	<i>Mercury Cadmium Telluride</i>
<b>MIR</b>	.....	Mittleres Infrarot
<b>NADPH</b>	.....	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>NMR</b>	.....	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>NOPA</b>	.....	<i>Noncollinear Optical Parametric Amplification</i>
<b>NTP</b>	.....	Nukleosidtriphosphat
<b>OD</b>	.....	Optische Dichte
<b>OPA</b>	.....	<i>Optical Parametric Amplification</i>
<b>OPO</b>	.....	<i>Optical Parametric Oscillation</i>
<b>PBS</b>	.....	<i>Polarizing Beam Splitter</i>
<b>PDE</b>	.....	Phosphodiesterase
<b>PFID</b>	.....	<i>Perturbed Free Induction Decay</i>
<b>PPLN</b>	.....	<i>Periodically Poled Lithium Niobate</i>
<b>PR</b>	.....	Proteorhodopsin
<b>pSB</b>	.....	Protonierte Schiff'sche Base
<b>PSG</b>	.....	Photostationäres Gleichgewicht
<b>RDH</b>	.....	Retinol-Dehydrogenase
<b>ROS</b>	.....	<i>Rod Outer Segment</i>
<b>RP</b>	.....	Retinitis Pigmentosa

---

<b>SB</b>	..... Schiff'sche Base
<b>SFG</b>	..... <i>Sum-Frequency Generation</i>
<b>SHG</b>	..... <i>Second Harmonic Generation</i>
<b>Thr</b>	..... Threonin
<b>TMD</b>	..... Transmembrane Domäne
<b>TMH</b>	..... Transmembrane Helix
<b>UV</b>	..... Ultraviolett
<b>Vis</b>	..... <i>Visible</i>
<b>WT</b>	..... Wildtyp
<b>YAG</b>	..... Yttrium-Aluminium-Granat



# Kapitel 1

## Vorwort

In allen Domänen des Lebens wird das Sonnenlicht für verschiedenste Zwecke genutzt. Ermöglicht wird dies durch photoaktivierbare Proteine, die die photonische Energie für biochemische Prozesse zugänglich machen.

In der Pflanzenwelt ermöglichen beispielsweise blaulicht-sensitive Phototropine optimiertes Pflanzenwachstum in Richtung des einfallenden Lichts (Phototropismus)[1, 2] oder die lichtorientierte Fortbewegung von Organismen (Phototaxis)[3]. Neben Phototropin ist Cryptochrom ein weiteres wichtiges Protein, das auf blaues Licht reagiert und nicht nur bei Pflanzen von großer Bedeutung ist[4]. Cryptochrom ist auch in der Retina von einigen Tieren vorzufinden. Es wird vermutet, dass dieses Protein bei Vögeln die Wahrnehmung des Magnetfelds der Erde ermöglicht[5, 6]. Weitere wichtige Photorezeptorklassen sind Phytochrome, die im Gegensatz zu Cryptochrom und Phototropin auf Licht im roten Spektralbereich reagieren, photosynthetische Systeme und Retinalproteine.

Retinalproteine wurden in allen drei Domänen des Lebens - Bakterien, Archaeen und Eukaryoten - nachgewiesen. Eines der wohl am besten untersuchten Systeme dieser Proteinklasse ist Rhodopsin[7-9], das Wirbeltiere (Vertebrata) und wirbellose Tiere (Invertebrata) zur visuellen Wahrnehmung befähigt. Rhodopsin reguliert die Hell-Dunkel-Adaption beim Sehen und befindet sich in sogenannten Stäbchenzellen. Es besteht aus dem Protein Opsin und einem Chromophor, dem 11-*cis*-Retinal, welcher kovalent an das Protein gebunden ist. Dieser kann ein Photon absorbieren und dadurch Konformationsänderungen des Proteins induzieren. Dies wiederum

aktiviert das G-Protein Transducin und setzt somit die visuelle Signaltransduktion in Gang. Rhodopsin gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), einer Proteinklasse von zentraler Wichtigkeit für die Entwicklung von Medikamenten. Etwa 30 % aller zugelassenen Arzneimittel treten in Wechselwirkung mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren[10]. Die Erforschung dieses Retinalproteins ist insofern nicht nur nützlich für das generelle Verständnis der GPCRs, sondern auch relevant für die Entwicklung von Medikamenten und der Untersuchung von Krankheiten.

Auch in Archaeen gibt es viele Retinalproteine, die verschiedene Funktionen in Organismen übernehmen. Sensorrhodopsin I und Sensorrhodopsin II beispielsweise ermöglichen Halobakterien eine phototaktische Fortbewegung über die Geißel[11, 12], während Halorhodopsin als lichtgetriebene Chloridionenpumpe in der Regulierung einer Zelle involviert ist[13, 14]. Das wohl am intensivsten studierte archaebakterielle Retinalprotein ist Bakteriorhodopsin[15]. Dieses Protein befördert Protonen über einen von Lichtenergie betriebenen Pumpprozess aus einer Zelle heraus. Der sich aufbauende Protonengradient wird von ATP-Synthase zur Speicherung biochemischer Energie genutzt, indem es Adenosintriphosphat bildet[16, 17]. Im Jahre 2013 wurde erstmals eine lichtgetriebene Natriumionenpumpe, das bakterielle Retinalprotein KR2, in einem Bakterium (*Krokinobacter eikastus*) entdeckt[18–20]. Dieser Ionentransporter hat seit dieser Zeit großes Interesse in der Optogenetik geweckt. Eingebaut in einer Nervenzelle, ermöglicht KR2 eine lichtgesteuerte Aktivität von Neuronen durch die Änderung der Konzentration an Natriumionen. Durch Mutationen in der Aminosäuresequenz lässt sich KR2 außerdem in eine Kaliumionenpumpe umwandeln[19]. Diese Eigenschaft könnte in Zukunft genutzt werden, um aktivierte Nervenzellen kontrolliert zu deaktivieren. Zusammen mit dem Retinalprotein Channelrhodopsin-2[21, 22], das sich als Calciumionenkanal bereits als nützliches optogenetisches Werkzeug etabliert hat[23–25], könnten diese beiden Ionentransporter gemeinsam eine photoinduzierte Aktivierung und Deaktivierung von Neuronen ermöglichen. Diese lichtbetriebene Steuerung lässt sich möglicherweise über den sogenannten BLQ-Effekt (*Blue Light Quenching*) noch weiter präzisieren. Mit dem BLQ-Effekt ist folgende Beobachtung gemeint: Wird ein lichtaktiviertes mikrobielles Retinalprotein (ein sensorisches Rhodopsin, ein Ionenkanal oder eine Ionenpumpe) mit Blaulicht beleuchtet, wird dessen Aktivität unterbunden und es kehrt zum inaktiven Grundzustand zurück[26, 27]. Dieser

Effekt wurde erstmals vor 40 Jahren an Bakteriorhodopsin entdeckt und wurde auf molekularer Ebene zeitaufgelöst bisher nur an diesem untersucht. Eine Studie auf ultrakurzer Zeitskala fehlt allerdings auch für diesen Protonentransporter. Eine Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus auf molekularer Ebene könnte für optogenetische Zwecke nützlich werden, da der BLQ-Effekt eine präzisere Steuerung beispielsweise des Calciumtransports in Channelrhodopsin-2 ermöglichen würde.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit erstmals die photoinduzierte Deaktivierungsdynamik des BLQ-Effekts eines Retinalproteins auf einer ultrakurzen Zeitskala untersucht. Diese Studie erfolgte an der Protonendonormutante E108Q der bakteriellen Protonenpumpe Proteorhodopsin[28, 29]. Außerdem wurde der Photozyklus und die frühe Photoreaktion dieser Mutante untersucht und mit dem Wildtyp vergleichend diskutiert.

Eine Deaktivierungsdynamik völlig anderer Natur findet sich auch in der visuellen Signaltransduktion von Rhodopsin. Diese Dynamik wird enzymatisch über das Protein Arrestin gesteuert[30, 31]. Arrestin kann an photoaktiviertes Rhodopsin binden und auf diesem Wege die Aktivierung des G-Proteins blocken, was zum Abbruch der Signaltransduktion führt. Diese Wechselwirkung zwischen Arrestin und dem Photorezeptor wurde in der vorliegenden Arbeit mit optischer, zeitaufgelöster Spektroskopie untersucht.

In einer weiteren Studie über visuelles Rhodopsin wurde die Photodynamik zweier Mutanten untersucht. Zum einen wurde der Photozerfall durch die Mutation G90D zeitaufgelöst untersucht, die in Verbindung mit angeborener (kongenitaler) stationärer Nachtblindheit gebracht wird[32, 33]. Zum anderen war die Doppelmutation N2C und D282C Gegenstand der Untersuchung, die zur Bildung einer stabilisierenden Disulfidbrücke zwischen den beiden eingefügten Cysteinen im extrazellulären Bereich führt.



# Kapitel 2

## Experimentelles

### 2.1 Blitzlichtphotolyse

Um transiente Absorptionsänderungen von einigen 10 Nanosekunden bis Sekunden zu messen, werden Blitzlichtphotolyseexperimente durchgeführt. Ein ns-Lichtpuls induziert eine Photodynamik in einer Probe, die über die Detektion von  $\mu\text{s}$ -Weißlichtpulsen nach Transmission durch das selbe Probenvolumen gemessen wird. Im Folgenden wird der experimentelle Aufbau und die Funktionsweise seiner wichtigsten Komponenten erläutert. Abschließend wird die Datenaufnahme erklärt.

#### 2.1.1 Der Anregepuls

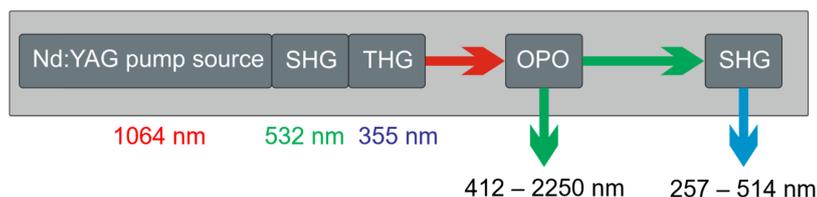


Abbildung 2.1: Schema zum Nd:YAG-Lasersystem gekoppelt mit einer OPO- und SHG-Einheit (Details siehe Text).

Basis für die Erzeugung des Anregepulses ist ein Nd:YAG-Laser (Spitlight 600 Innolas Laser GmbH). Das aktive Medium dieses Festkörperlaser ist ein Yttrium-Aluminium-Granat  $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$  Kristall, der mit Neodym ( $\text{Nd}^{3+}$ ) dotiert ist. Dieser erzeugt Laserstrahlung mit einer zentralen Wellenlänge

von 1064 nm. Für die Erzeugung von Besetzungsinversion wird eine Xenon-Blitzlichtlampe verwendet, das Licht bei 808 nm emittiert. Der Laser wird über eine Pockelszelle gütegeschaltet betrieben, um kurze intensive Pulse im Nanosekundenbereich zu generieren. Aus der Kavität werden diese nahinfraroten Lichtpulse mit einer Energie von etwa 800 mJ herausgekoppelt und durch einen Lithiumtriborat-Kristall (LBO) gelenkt. Hier werden über Frequenzverdopplung 425 mJ Pulse bei einer Wellenlänge von 532 nm generiert. Dieser Lichtpuls überlagert sich in einem zweiten LBO-Kristall mit einem Teil des transmittierten Fundamentalpulses. Bei diesem Prozess werden UV-Pulse mit einer Energie von 250 mJ generiert. Die zentrale Wellenlänge liegt bei 355 nm.

Um den Anregepuls spektral anpassen zu können, werden diese UV-Pulse in einem optisch parametrischen Oszillator (preciScan, GWU-Lasertechnik) genutzt, um Lichtpulse im Bereich von 412 - 2550 nm zu erzeugen. Der optisch parametrische Prozess findet in einem Typ-II  $\beta$ -BaB<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (BBO) Kristall statt. Durch Anpassung des Kippwinkels lässt sich ein Seed-Puls zwischen 412 und 709 nm beziehungsweise ein Idler-Puls zwischen 710 und 2550 nm generieren. Die Polarisation des Seed-Pulses ist vertikal und die des Idler-Pulses horizontal.

Der Anregungspuls, der im OPO generiert wird, kann genutzt werden, um die Anregungswellenlänge weiter in den UV-Bereich zu schieben. Dazu ist der Strahl in den uvScan (GWU-Lasertechnik) zu justieren, in dem über Frequenzverdopplung ein Anregungspuls zwischen 257 und 514 nm generiert wird. Hierbei ist zu beachten, dass der Typ II-BBO-Kristall mit dem Typ I-BBO-Kristall über den Motor ausgetauscht werden muss. Vor dem Verlassen des uvScans durchläuft der Strahl schließlich ein Pellin-Broca-Prisma, um die gewünschte Wellenlänge zu separieren. Dieses Lasersystem ist schematisch in Abbildung 2.1 illustriert.

### 2.1.2 Der Abfragepuls

Für die Detektion werden Weißlichtpulse über eine Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu 60 W L7685) generiert. Das Spektrum erstreckt sich von 190 nm bis 2000 nm und die Pulsdauer beträgt 3  $\mu$ s.

In Abbildung 2.2 ist der sichtbare Bereich des Detektionslichtes in rot dar-

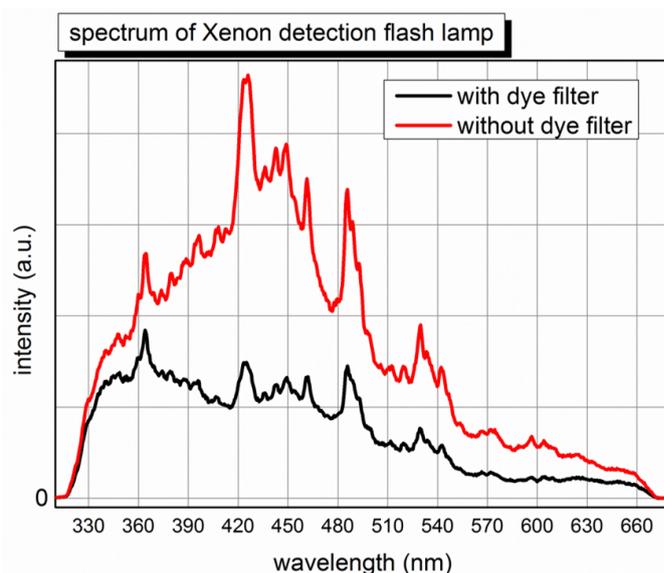


Abbildung 2.2: Abfragelicht in der Blitzlichtphotolyse mit und ohne Filterung.

gestellt. Im Experiment ist es von Vorteil, wenn die spektrale Verteilung möglichst homogen ist, um den dynamischen Bereich in der Detektion für das gesamte Spektrum zu maximieren. Aus diesem Grund wird in den meisten Fällen das durch den in Ethanol gelösten Farbstoff Coumarin 153 transmittierte Weißlicht für die Blitzlichtphotolyse verwendet (Abbildung 2.2, schwarze Kurve). Die Pulse werden mit einer Repetitionsrate von maximal 100 Hz generiert.

### 2.1.3 Der experimentelle Aufbau

In Abbildung 2.3 ist der gesamte experimentelle Aufbau der Blitzlichtphotolyse schematisch dargestellt.

Der Nd:YAG-Laser generiert in Kombination mit dem OPO-System den Anregepuls, der vor Eintritt in die Probe über eine mechanische Strahlklappe geblockt werden kann. Im rechten Winkel zur Strahlrichtung der Anregung transmittiert das Detektionslicht von der Xenon-Blitzlichtlampe durch die Probe und trifft anschließend auf den Detektor. Direkt hinter dem Ausgang der Blitzlichtlampe befindet sich ein variabel einstellbarer OD-Filter und eine Lochblende (nicht gezeigt in Abbildung 2.3). Ein Strahlteiler vor der Probe lenkt einen Teil des Abfragelichtes ab und leitet ihn über einen Umlenkspiegel direkt in den Detektor.

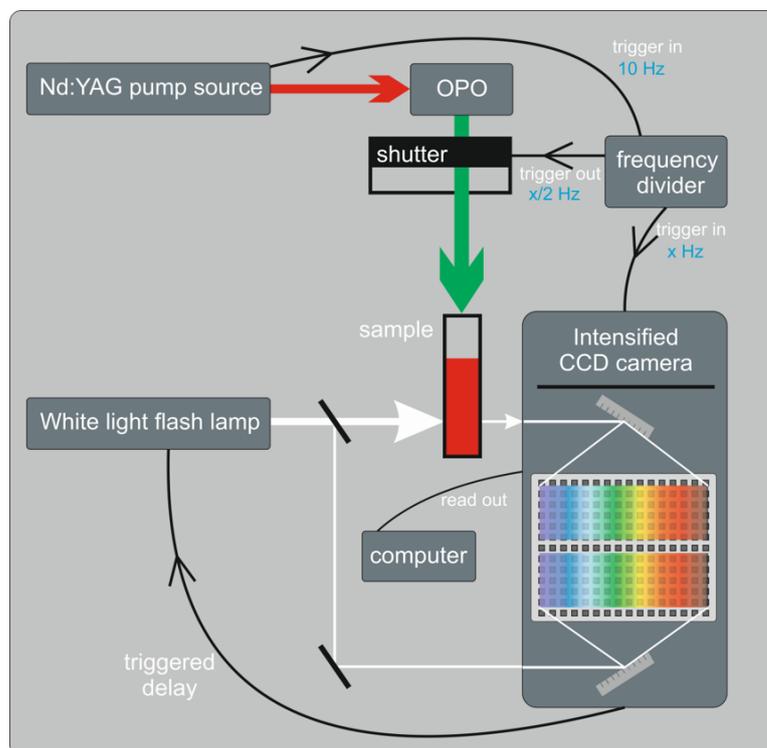


Abbildung 2.3: Experimenteller Aufbau der Blitzlichtphotolyse. Abkürzungen: OPO, Optical Parametric Oscillator; CCD, Charge-Coupled Device. Die in die ICCD-Kamera einfallenden Weißlichtpulse werden beide über das selbe Gitter auf die CCD-Sensorfläche gelenkt. Dass in diesem Schema zwei separate Gitter gezeigt sind, soll nur zur Veranschaulichung des Prinzips dienen.

Der Frequenzgenerator des Nd:YAG-Lasers liefert ein Triggersignal an einen Frequenzteiler. Dieser generiert daraus ein Signal mit der  $1/x$ -fachen und ein Signal mit der  $1/2x$ -fachen Frequenz des Triggers ( $x \in \mathbb{N}$ ). In Kapitel 2.1.4 wird auf dieses Gerät und seine Funktion näher eingegangen. Die  $1/x$ -fache Frequenz wird an das Detektorsystem weitergeleitet und das Signal mit der  $1/2x$ -fachen Frequenz wird als Schaltfrequenz für den Strahlblocker des Anregelichtes verwendet. Das Detektorsystem wiederum steuert die Quelle des Abfragelichtes an.

Zur Detektion wird die ICCD (engl.: Intensified charge-coupled device; dt.: intensiviertes ladungsgekoppeltes Bauteil) Kamera PI-MAX 3 (Princeton Instruments) verwendet. Die Sensorfläche besteht aus  $1024 \times 256$  Pixeln. Über ein Gitter kann die spektrale Verteilung des einfallenden Lichtes verschoben werden. Daraus ergibt sich eine spektrale Auflösung von  $0,56 \text{ nm}$ . Die Pixelausleserate liegt bei  $2 \text{ MHz}$ . Im Experiment sind pro Bild zwei Re-

gionen aus dem 1024 x 256 Pixelfeld herauszulesen. Diese Ausleserate liegt bei 240 Hz.

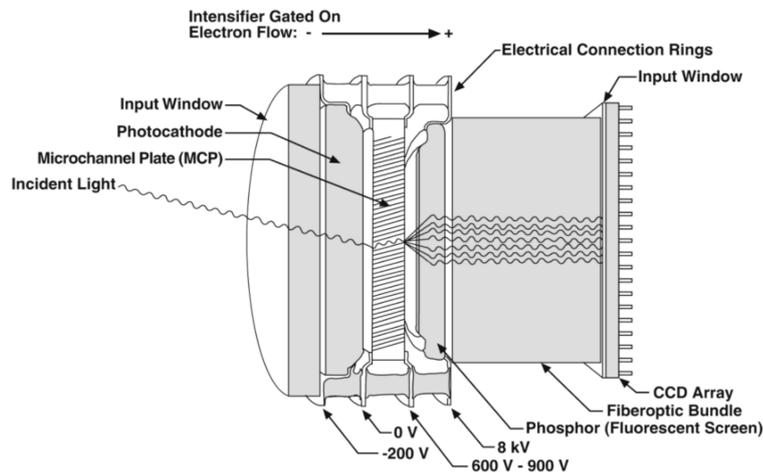


Abbildung 2.4: Detektor der ICCD-Kamera[34].

Die Detektionstechnik funktioniert wie folgt: Licht fällt auf eine Photokathode. Die freigesetzten Elektronen durchlaufen daraufhin eine Mikrokanalplatte, was zu einer Vervielfachung der Elektronenanzahl führt. Diese treffen anschließend auf einen Fluoreszenzschirm. Die dadurch entstehenden Photonen werden schließlich über Glasfaseroptik pixelaufgelöst auf die CCD-Detektionsfläche gelenkt. Die auf eine Photodiode (Pixel) auftreffende Photonenzahl führt zu einer dazu proportionalen Ladungsmenge. Das Auslesen dieser Ladung wird auf 16 bit digitalisiert. Über die Spannung zwischen der Photokathode und der Multikanalplatte kann nun die Verstärkung des Signals reguliert werden, was zu einer hohen Sensitivität führt. Wenn die Spannung umgekehrt wird, führt dies schlagartig dazu, dass kein Licht mehr detektiert werden kann, da aus der Photokathode herausgelöste Elektronen nicht mehr zur Multikanalplatte beschleunigt werden. Der Aufbau des ICCD-Detektors ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

#### 2.1.4 Synchronisation

Für ein Blitzlichtphotolyseexperiment müssen mehrere Geräte des Aufbaus zeitlich aufeinander abgestimmt sein. Das Schließen und Öffnen des Strahl-

blockers, die zeitliche Verzögerung zwischen Anregepuls, Abfragepuls und der Messzeit der ICCD-Kamera müssen zueinander synchronisiert sein. Das Haupttriggersignal ist die 10 Hz-Frequenz der Pockelszelle des Nd:YAG-Lasers. Ohne Nutzung des Strahlblockers liegt die Repetitionsrate des Anregepulses ebenfalls bei 10 Hz. Je nach Experiment ist es jedoch erforderlich, die Anregungsrate zu verkleinern. Aus diesem Grund wurde der Frequenzteiler gebaut. Dieser teilt die eingehende Frequenz von 10 Hz durch einen manuell einzustellenden Wert  $x$ . Daraus entstehen zwei Signale mit den Frequenzen  $\frac{10}{x}$  Hz und  $\frac{10}{2x}$  Hz, die über zwei BNC-Ausgänge abgreifbar sind. Um die Messung von  $I_{0,ref}(\lambda)$  und  $I_0(\lambda)$  (siehe nächstes Unterkapitel und Abbildung 2.6) zu ermöglichen, muss die Anregefrequenz halb so groß sein wie die Abfrage- beziehungsweise Detektionsfrequenz der ICCD-Kamera. Folglich wird der Strahlblocker mit dem  $\frac{10}{2x}$  Hz Signal getriggert, während die ICCD-Kamera und die Blitzlichtlampe mit der doppelten Frequenz angesteuert werden.

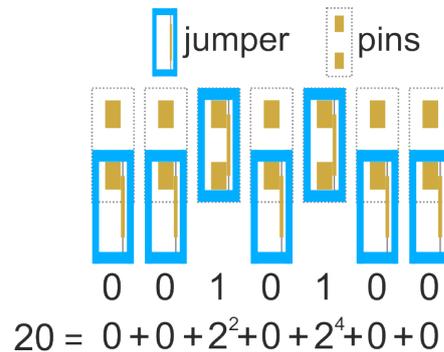


Abbildung 2.5: Beispieleinstellung des Frequenzdivisors mit Divisor 20. Dieser lautet in inverser binärer Notation 00101. Entsprechend sind die Jumper zu setzen.

Um den Divisor  $x$  im Frequenzteiler einzustellen, ist Folgendes zu beachten:  $x$  muss eine natürliche Zahl sein. Diese wird als Binärcode über die Aktivierung und Deaktivierung von hintereinander geschalteten Pins eingestellt. Sei  $x = 20$ . Diese Zahl lautet im Binärsystem bei inverser Darstellung 00101. Demgemäß müsste auf das dritte und fünfte Pin-Paar ein Jumper gesetzt werden, wie es Abbildung 2.5 illustriert. Dies hätte zur Folge, dass die Abfragepulse mit einer Frequenz von  $1/2$  Hz beziehungsweise einer Periodendauer von zwei Sekunden generiert werden.

### 2.1.5 Datenerfassung

Um die Absorptionsänderung einer Probe zu einem Zeitpunkt  $t$  zu erhalten, werden vier verschiedene Spektren aufgenommen. Zunächst wird die spektrale Intensitätsverteilung vom Weißlicht vor ( $I_{0,ref}(\lambda)$ ) und nach Transmission ( $I_0(\lambda)$ ) durch die unangeregte Probe detektiert (siehe Abbildung 2.6 links). Anschließend wird die Probe optisch angeregt und zu einer vorher einzustellenden Verzögerungszeit wird die Weißlichtmessung wiederholt. Die gemessenen spektralen Verteilungen bei angeregter Probe werden entsprechend mit  $I(\lambda)$  und  $I_{ref}(\lambda)$  bezeichnet (siehe auch Abbildung 2.6 rechts). Das Messen der Referenzsignale  $I_{0,ref}(\lambda)$  und  $I_{ref}(\lambda)$ , hat folgenden Grund: Die Blitzlichtlampe generiert Weißlichtpulse mit einem gewissen Maß an Puls-zu-Puls-Schwankungen. Dies verschlechtert ohne dessen Beachtung in der Messtechnik das Signal-zu-Rausch-Verhältnis erheblich. Aus diesem Grund wird jedes aufgenommene Transmissionsspektrum durch das Spektrum des dafür genutzten Weißlichtpulses geteilt. Diese Referenzierung bringt den Vorteil mit sich, dass sich Intensitätsschwankungen bedingt durch die Blitzlichtlampe aufheben. Um nun aus diesen vier Messgrößen die Absorptionsänderung  $\Delta A$  zur Verzögerungszeit  $t$  zu gewinnen, wird Folgendes berechnet:

$$\Delta A(t) = -\log \frac{I}{I_{ref}} - \log \frac{I_0}{I_{0,ref}} = -\log \frac{I * I_{0,ref}}{I_0 * I_{ref}}. \quad (2.1)$$

Wie Abbildung 2.6 illustriert, wird jedes in die ICCD-Kamera einfallende Signal über das Gitter auf die CCD-Sensorfläche projiziert (die Einkopplung des Lichts in die Kamera erfolgt über Faserbündel). Das Licht ist dadurch entlang der Photodiodenreihen spektral aufgelöst. Die vertikale Ausleuchtung erstreckt sich dabei über mehrere Spalten.

## 2.2 Ultrakurzzeitspektroskopie

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen erläutert, die die Messung von zeitaufgelösten Absorptionsänderungen auf einer Femtosekun-

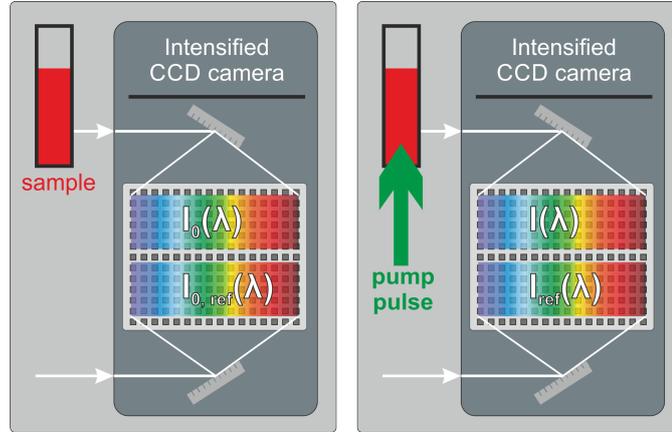


Abbildung 2.6: Messschema der Blitzlichtphotolyse.

denzeitskala erst ermöglichen. Dies umfasst nichtlinear optische Effekte, grundlegende Konzepte zur Femtosekundenlasertechnik und schließlich die experimentelle Durchführung im sichtbaren und mittleren Infrarotbereich.

### 2.2.1 Nichtlineare Optik

Die optische Spektroskopie von ultraschnellen Prozessen ist nur durch bestimmte nichtlineare Effekte zwischen Licht und Materie möglich. Sie bilden die Basis für zahlreiche transiente Messtechniken. Die Grundlagen zu diesem Feld der nichtlinearen Optik werden in diesem Kapitel vorgestellt.

#### Lineare Wellengleichung

Das Fundament zur mathematischen Beschreibung von Licht bilden in der klassischen Physik die Maxwellgleichungen:

$$\nabla \times \vec{E}(t) + \frac{\partial}{\partial t} \vec{B}(t) = 0, \quad (2.2)$$

$$\nabla \times \vec{H}(t) - \vec{J}(t) - \frac{\partial}{\partial t} \vec{D}(t) = 0, \quad (2.3)$$

$$\nabla \vec{D}(t) - \rho = 0, \quad (2.4)$$

$$\nabla \vec{B}(t) = 0. \quad (2.5)$$

Das elektrische Feld wird durch  $\vec{E}(t)$  beschrieben,  $\vec{H}(t)$  ist das magnetische Feld,  $\vec{D}(t)$  die elektrische Verschiebungsdichte,  $\vec{B}(t)$  die magnetische Flussdichte,  $\vec{J}(t)$  die Stromdichte und  $\rho$  steht für die Ladungsdichte.

Im Folgenden wird angenommen, dass der Raum strom- und ladungsfrei sei:

$$\vec{J}(t) = 0, \rho = 0.$$

Des Weiteren wird ein lineares, homogenes und isotropes Medium gewählt. Die magnetische Flussdichte ist nun proportional zu dem magnetischen Feld mit dem Proportionalitätsfaktor  $\mu_0\mu_r$ :

$$\vec{B}(t) = \mu_r\mu_0\vec{H}(t), \quad (2.6)$$

$\mu_r$  und  $\mu_0$  nennen sich materialspezifische, relative Permeabilität beziehungsweise magnetische Feldkonstante. Analog dazu lässt sich die elektrische Verschiebungsdichte ebenfalls in einem linearen Bezug zum elektrischen Feld ausdrücken:

$$\vec{D}(t) = \epsilon_r\epsilon_0\vec{E}(t). \quad (2.7)$$

$\epsilon_r$  beschreibt die materialspezifische Permittivität und  $\epsilon_0$  steht für die Dielektrizitätskonstante. Diese Bedingungen vereinfachen die Maxwellgleichungen zu:

$$\nabla \times \vec{E}(t) + \frac{\partial}{\partial t}\vec{B}(t) = 0, \quad (2.8)$$

$$\nabla \times \vec{B}(t) - \mu_r\mu_0\epsilon_r\epsilon_0\frac{\partial}{\partial t}\vec{E}(t) = 0, \quad (2.9)$$

$$\nabla\vec{E}(t) = 0, \quad (2.10)$$

$$\nabla\vec{B}(t) = 0. \quad (2.11)$$

Gleichungen 2.8 und 2.9 lassen sich umformen, indem auf sie der Rotationsoperator angewandt wird. Es lässt sich unter Berücksichtigung von Gleichungen 2.10 und 2.11 folgern:

$$\nabla \times (\nabla \times \vec{E}(t)) = \underbrace{\nabla(\nabla\vec{E}(t))}_{=0} - \Delta\vec{E}(t) = -\mu_r\mu_0\epsilon_r\epsilon_0\frac{\partial^2}{\partial t^2}\vec{E}(t), \quad (2.12)$$

$$\nabla \times (\nabla \times \vec{B}(t)) = \underbrace{\nabla(\nabla\vec{B}(t))}_{=0} - \Delta\vec{B}(t) = -\mu_r\mu_0\epsilon_r\epsilon_0\frac{\partial^2}{\partial t^2}\vec{B}(t). \quad (2.13)$$

Diese Gleichungen lassen sich zu folgender Gleichung zusammenfassen:

$$\left(\Delta - \frac{n^2}{c_0^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right)\psi(\vec{r}, t) = 0. \quad (2.14)$$

Diese wird homogene, lineare Wellengleichung genannt, wobei  $\psi$  für jede Komponente des elektrischen oder magnetischen Feldes steht.  $n$  wird als Brechungsindex bezeichnet und berechnet sich aus  $n = \sqrt{\epsilon_r \mu_r}$ .  $c_0 = 1/\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}$  ist die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum. Eine Lösung dieser Wellengleichung ist die in  $z$ -Richtung propagierende ebene Welle

$$\vec{E}(z, t) = E_0 \cdot e^{-i(\omega t - kz)} \quad (2.15)$$

für die gilt:

$$\frac{\omega}{k} = \frac{c_0}{n}. \quad (2.16)$$

### Verschiebungspolarisation

Ein elektrisches Feld  $\vec{E}$  induziert in einem dielektrischen Medium durch Ladungsverschiebungen elektrische Dipole. Der Schwerpunkt negativer Ladungen (Elektronen) verschiebt sich relativ zum positiven Ladungsschwerpunkt. Dieser Effekt wird als Verschiebungspolarisation  $\vec{P}$  bezeichnet. Dies steht mit dem elektrischen Feld folgendermaßen in Zusammenhang:

$$\vec{P}(\omega) = \epsilon_0 \chi(\omega) \vec{E}(\omega). \quad (2.17)$$

$\epsilon_0$  steht für die Permittivität des Vakuums,  $\omega$  für die Kreisfrequenz des Lichtes und  $\chi$  ist die lineare Suszeptibilität. Diese Größe hängt direkt von der frequenzabhängigen Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon(\omega)$  ab:

$$\chi(\omega) = \epsilon(\omega) - 1. \quad (2.18)$$

Der Zusammenhang von Gleichung 2.17 ist allerdings nur eine Näherung für hinreichend schwache elektrische Felder. Im Allgemeinen treten weitere Terme höherer Ordnung in Erscheinung, die über Potenzreihenentwicklung folgenden Ausdruck finden:

$$\vec{P} = \epsilon_0 \left( \chi^{(1)} \vec{E} + (\chi^{(2)} \vec{E}) \vec{E} + ((\chi^{(3)} \vec{E}) \vec{E}) \vec{E} + \dots \right). \quad (2.19)$$

Die Suszeptibilität  $\chi^{(i)}$  ist im Allgemeinen ein  $i+1$ -stufiger Tensor.

Im letzten Unterkapitel wurde die lineare Wellengleichung vorgestellt. In ähnlicher Weise lässt sich analog eine nichtlineare Wellengleichung herleiten:

$$\frac{\partial^2}{\partial z^2} \vec{E} - \frac{n^2}{c_0^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E} = \mu_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{P}_{NL}. \quad (2.20)$$

Die nichtlinearen Terme aus Gleichung 2.19 werden hier mit  $\vec{P}_{NL}$  zusammengefasst. Nun sei angenommen, dass zwei monochromatische Wellen mit dem Medium wechselwirken. Das elektrische Feld lässt sich mit

$$E = E_1 \cos(\omega_1 t + k_1 z) + E_2 \cos(\omega_2 t + k_2 z) \quad (2.21)$$

beschreiben. Der quadratische Teil von Gleichung 2.19 findet demnach folgenden Ausdruck bei  $z = 0$ :

$$P^{(2)}(\omega) = \frac{\epsilon_0}{2} \chi^{(2)} \left( (E_1^2 + E_2^2) + E_1^2 \cos(2\omega_1 t) + E_2^2 \cos(2\omega_2 t) + 2E_1 E_2 \cos(\omega_1 + \omega_2)t + 2E_1 E_2 \cos(\omega_1 - \omega_2)t \right) \quad (2.22)$$

Folglich besteht die nichtlineare Polarisation bezüglich  $\chi^{(2)}$  aus einem konstanten Term (optische Gleichrichtung), Terme mit der jeweils doppelten Frequenz der beiden Eingangsfrequenzen (SHG, engl.: Second Harmonic Generation) und Anteilen, die mit der Differenzfrequenz (DFG, engl.: Difference Frequency Generation) beziehungsweise Summenfrequenz (SFG, engl.: Sum Frequency Generation) oszillieren.

Bei starken elektrischen Feldern finden zusätzlich  $\chi^{(3)}$ -Prozesse statt. Beispiele hierfür sind Frequenzverdreifung, Vier-Wellen-Mischen, Selbstfokussierung, Selbstphasenmodulation, Rayleigh- und Ramanstreuung.

### Phasenanpassung

Wie im vorangegangenen Kapitel diskutiert, induziert ein externes elektrisches Feld in einem nichtlinearen Medium atomare Dipole, die wiederum Wellen abstrahlen. Mit einer Frequenz von  $\omega$  bewegen sich diese mit der Phasengeschwindigkeit  $\nu_{Ph}$  durch den Kristall:

$$\nu_{Ph} = \frac{\omega}{k} = \frac{c_0}{n(\omega)} \quad (2.23)$$

$n(\omega)$  ist der materialspezifische, frequenzabhängige Brechungsindex. Konstruktive Interferenz mit allen mikroskopischen Anteilen kann nur dann stattfinden, wenn die Geschwindigkeit derjenigen Welle gleich der Phasengeschwindigkeit ist, die die Polarisation im Medium induziert. Hierbei spricht man von der Phasenanpassungsbedingung

$$\vec{k}(\omega_1 \pm \omega_2) = \vec{k}(\omega_1) \pm \vec{k}(\omega_2), \quad (2.24)$$

die auch gleichzeitig die photonische Impulserhaltung eines Frequenzmischungsprozesses darstellt. Dieser Prozess ist am effizientesten, wenn die  $\vec{k}$ -Vektoren der drei beteiligten Wellen nicht auseinanderlaufen, folglich eine kollineare Ausbreitung stattfindet. Dadurch vereinfacht sich die Bedingung 2.24 zu

$$n_3\omega_3 = n_1\omega_1 \pm n_2\omega_2. \quad (2.25)$$

Neben der Impulserhaltung muss außerdem die Energieerhaltung der beteiligten Photonen gelten:

$$\omega_3 = \omega_1 \pm \omega_2. \quad (2.26)$$

In einem doppelbrechenden Kristall lässt sich diese Bedingung erfüllen. Bei einem optisch einachsigen Kristall sind zwei der drei Hauptachsen gleich. Ein einfallender Lichtstrahl lässt sich nun in zwei Komponenten zerlegen. Der  $\vec{k}$ -Vektor des einfallenden Strahles und die optische Achse des Kristalls bilden zusammen eine Ebene, der sogenannte Hauptschnitt. Die Komponente des Strahles, dessen elektrisches Feld senkrecht zu dieser Ebene steht, wird ordentlicher Strahl genannt. Die Komponente, die im Hauptschnitt oszilliert, wird als außerordentlicher Strahl bezeichnet. Propagiert der Strahl entlang der optischen Achse, erfährt jede Polarisationskomponente den gleichen Brechungsindex. Der Zusammenhang zwischen den beiden Brechungsindizes bezüglich des ordentlichen und außerordentlichen Strahles ist für einen einachsigen positiv doppelbrechenden Kristall ellipsoidenförmig:

$$\frac{1}{n_a^2(\theta)} = \frac{\cos^2 \theta}{n_o^2(\theta)} + \frac{\sin^2 \theta}{n_a^2(\theta)}. \quad (2.27)$$

Dieser Zusammenhang wird auch Index-Ellipsoid genannt und ist in Abbildung 2.7 illustriert. Index  $a$  steht für außerordentlich und  $o$  für ordentlich.  $\theta$  gibt den Winkel zwischen der optischen Achse und dem  $\vec{k}$ -Vektor an. Ein

uniaxialer Kristall ist negativ axial, wenn gilt  $n_a < n_o$  beziehungsweise positiv axial für den komplementären Fall.

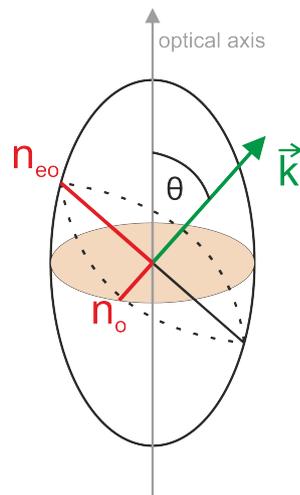


Abbildung 2.7: Index-Ellipsoid für einen einachsigen doppelbrechenden Kristall.

Für den Fall der Frequenzverdoppelung lässt sich im Allgemeinen ein Winkel  $\theta$  finden, sodass gilt:

$$n_a(2\omega) = n_o(\omega). \quad (2.28)$$

In diesem Fall sind die beiden einfallenden elektrischen Felder mit der Kreisfrequenz  $\omega$  beide entweder ordentlich oder beide außerordentlich polarisiert. Dies wird Typ I-Phasenanpassung genannt. Um Typ II-Phasenanpassung handelt es sich, wenn die Polarisierungen der beiden einfallenden  $\vec{E}$ -Felder gegensätzlich polarisiert sind: außerordentlich und ordentlich beziehungsweise umgekehrt. Prinzipiell haben die Strahlrichtungen des ordentlichen und außerordentlichen Strahles verschiedene Richtungen. Die Folge ist, dass das Überlappvolumen mit zunehmender Eindringtiefe schlechter wird. Dieser Effekt wird auch räumlicher Walk-off genannt. Außerdem führen Unterschiede in der Gruppengeschwindigkeit der ein- und auslaufenden Strahlen zum Verlust der Phasenanpassung (zeitlicher Walk-off). Diese Effekte führen dazu, dass die Länge eines Kristalls für effiziente Frequenzverdoppelung limitiert ist.

### Kollinearer parametrischer Prozess

In den geschilderten nichtlinearen Prozessen dreier Photonen ist nicht nur der Impuls eine Erhaltungsgröße (siehe Gleichung 2.24), sondern auch die Energie:

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_2 + \hbar\omega_1. \quad (2.29)$$

Insofern ist auch der umgekehrte Prozess möglich: Anstatt aus 2 einfallenden Photonen 1 neues Photon mit beispielsweise der Summenfrequenz im Kristall zu generieren, lässt sich 1 einfallendes Photon zu 2 konvertieren. Dazu ist ein energiereiches Photon notwendig. Beispielsweise lässt sich aus einem Photon des blauen Spektralbereichs eines im sichtbaren und eines im infraroten Bereich generieren. Dieser Prozess wird optisch parametrischer Effekt genannt. Die Eingangswelle wird üblicherweise Pump-Welle genannt, die gewünschte Produktwelle heißt Seed-Welle. Die dritte Komponente wird Idler-Welle genannt. Je nach Kippwinkel und Art des Kristalls können nun verschiedene Seed-Idler-Paare generiert werden, die sich energetisch unterscheiden, in der Summe allerdings der Energie des Pump-Photons entsprechen. Wird nun neben dem Pump-Photon zusätzlich ein Photon der Energie des Seeds in den Kristall gebracht, so wird dieses Licht im Zuge des parametrischen Prozesses verstärkt. Dies wird optisch parametrische Verstärkung (engl.: Optical Parametric Amplification, OPA) genannt. Ist der Kristall zusätzlich in eine Kavität gefasst, so wird dieses Seed-Licht von Umlauf zu Umlauf immer intensiver, was als optisch parametrischer Oszillator (OPO) bezeichnet wird.

### Nicht-kollinearer parametrischer Prozess

Wie bereits erwähnt, ist die Effizienz bei diesen kollinearen Prozessen dadurch limitiert, dass zwar die Phasengeschwindigkeiten angepasst sind, nicht aber die Gruppengeschwindigkeiten. Die drei Lichtpulse propagieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch den Kristall. Dies ist für die Ultrakurzzeitspektroskopie von Nachteil, da dies zur Folge hat, dass der Gesamtausgangspuls nach den nichtlinearen Prozessen im Kristall verlängert ist. Dies soll mit folgendem Beispiel anschaulich erläutert werden:

In einem  $\beta$ -BBO-Kristall propagiert ein blauer Pumpimpuls mit einer zeitli-

chen Länge von wenigen 100 Femtosekunden. Gleichzeitig durchwandert ein wesentlich kürzerer Seed-Puls im grünen Spektralbereich das Medium. Dieser wird parametrisch verstärkt und parallel dazu wird ein ebenfalls kurzer Idler-Puls im Infrarotbereich generiert. Dieser hat eine höhere Gruppengeschwindigkeit als der Seed-Puls. Zu einem gewissen Zeitpunkt verlieren die beiden Pulse räumlichen Überlapp. Die Folge ist, dass sowohl der Seed als auch der Idler gleichermaßen verstärkt werden, solange sie mit dem Pump-Puls räumlich und zeitlich überlappen. Dies wiederum führt dazu, dass der Ausgangspuls zeitlich gestreckt wird, da sich nun im vorderen Bereich dieses Pulses zusätzlich mehr grüne Seed-Photonen und im hinteren Bereich mehr Idler-Photonen befinden.

Dieser Umstand kann umgangen werden, indem Seed und Pump nicht-kollinear zueinander in den Kristall eindringen. Der Winkel  $\Psi$  zwischen Seed-Puls und Idler-Puls muss dabei so gewählt werden, dass die Projektion des Gruppengeschwindigkeitsvektors des Idlers auf den des Seeds gleich wird. Dieser lässt sich approximativ über

$$\Psi = \phi \left( 1 + \frac{\lambda_{Idler}}{\lambda_{Signal}} \right) \quad (2.30)$$

berechnen.  $\phi$  ist dabei der Winkel zwischen den  $\vec{k}$ -Vektoren des Pump- und Seedstrahls. Vorteil ist, dass der erzeugte Puls kurz bleibt. Außerdem ist es damit möglich, spektral breite Pulse effizient zu verstärken, die anschließend über einen Prismenkompressor zu ultrakurzen Pulsen geformt werden können. Nachteil ist, dass der Puls transversal leicht verbreitert. Dieser Prozess wird nicht-kollineare optisch parametrische Verstärkung (engl.: Noncollinear Optical Parametric Amplification, NOPA) genannt[35–38].

Das Konzept von NOPAs ist in der optischen Ultrakurzzeitspektroskopie von großer Bedeutung. Es ermöglicht die Erzeugung von intensiven fs-Pulsen bei variabel einstellbarer Wellenlänge im sichtbaren und nahen Infrarotbereich, je nach dem, ob der Idler- oder der verstärkte Seed-Puls im Experiment genutzt werden soll. Um dies zu realisieren, wird als Seed ein ps-Weißlichtpuls genutzt. Aufgrund von Dispersion liegen die spektralen Anteile nicht zeitlich übereinander. Der vordere Teil ist spektral rotverschoben, während das hintere Ende des Pulses kurzwellige Komponenten trägt. Dieser Effekt wird auch als positiver Chirp bezeichnet. Ein negativer Chirp hat eine entsprechend umgekehrte zeitliche Anordnung der Frequenzanteile. Über eine opti-

sche Verzögerungsstrecke lässt sich nun der Überlapp der gewünschten Frequenz des Weißlichts mit dem Pumpuls im Kristall einstellen.

Das bereits mehrfach erwähnte Weißlicht wird auch Superkontinuum genannt. Dessen Entstehung ist nicht gänzlich verstanden, allerdings lassen sich einige Effekte nennen, die wesentlich zu dessen Erzeugung beitragen. Diese sind Selbstphasenmodulation, Filamentenerzeugung, Gruppengeschwindigkeitsdispersion, Plasmadefokussierung und Selbstfokussierung.

### 2.2.2 Prinzip eines Kurzpulsasers

Die Durchführung von transienten Absorptionsmessungen ultraschneller Prozesse ist nur möglich, sofern Laserpulse von Femtosekundendauer zur Verfügung stehen. In diesem Abschnitt wird auf die Erzeugung von Pulsen im Nano- bis Femtosekundenbereich eingegangen.

Für die Generierung von Pulsen im Nano- bis Pikosekundenbereich, gibt es mehrere Möglichkeiten. Beim Prinzip der Güteschaltung (engl.: *Q*-Switching) wird der sogenannte Güte-Faktor verändert. Dieser Faktor gibt das Verhältnis zwischen der in der Kavität gespeicherten Energie und den Verlusten pro Umlauf im Resonator wieder:

$$Q = 2\pi \frac{E_{imResonator}}{E_{Verlust/Umlauf}} \quad (2.31)$$

Das aktive Medium wird kontinuierlich gepumpt, um Besetzungsinversion zu erzeugen. Dabei wird mittels eines Güteschalters (beispielsweise eine Pokkelszelle oder ein akustooptischer Modulator) dafür Sorge getragen, dass die Verluste pro Umlauf zu hoch sind, um das System in den Laserbetrieb überführen zu können. Währenddessen steigt die intrakavitäre Energie kontinuierlich, bis zu einem gewissen Zeitpunkt der Güteschalter aktiviert wird, was zur Folge hat, dass die Verluste schlagartig fallen. Der Güte-Faktor springt zu einem verhältnismäßig sehr hohen Wert. Es entsteht ein sehr intensiver Puls, dessen zeitliche Breite dadurch bestimmt ist, wie schnell *Q* wieder kleiner als 1 wird. Eine schematische Darstellung dieses Prinzips ist in Abbildung 2.8 illustriert.

Eine sehr ähnliche Strategie verfolgt das Prinzip der Verstärkungsschaltung (engl.: *Gain*-Switching). In dieser Methode werden nicht die Verluste modu-

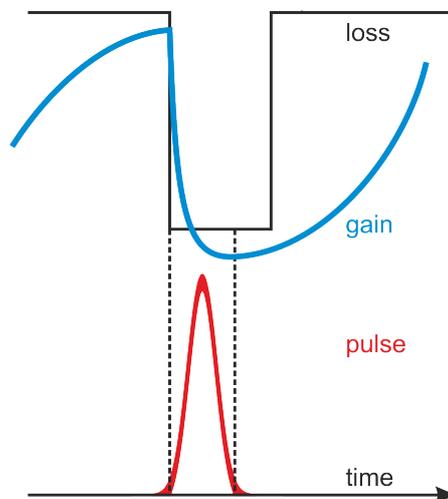


Abbildung 2.8: Darstellung der Güteschaltung (Q-Switching). Der schwarze Verlauf stellt den zeitlichen Verlauf der Verluste dar. Die blaue Kurve gibt die zeitabhängige Verstärkung des gepumpten aktiven Mediums wieder. Innerhalb des mit gestrichelten Linien versehenen Zeitfensters bildet sich ein optischer Nanosekundenpuls (rot).

liert wie beim  $Q$ -Switching, sondern die Pumpleistung. Ein sich bildender Puls kann dann nur verstärkt werden, solange das aktive Medium gepumpt wird, was die Besetzungsinversion aufrecht erhalten soll.

Das Verfahren zur Erzeugung von Femtosekundenpulsen beruht im Rahmen dieser Arbeit auf dem Prinzip der passiven Modenkopplung. Bevor dies erläutert werden kann, wird im Folgenden zunächst auf die aktive Modenkopplung eingegangen.

### Aktive Modenkopplung

Prinzipiell können im Resonator eines Lasers viele verschiedene Moden anschwingen. Diese oszillieren im Allgemeinen unabhängig voneinander. Gelingt es nun, diese in Phase zueinander zu koppeln, bildet sich daraus in der Summe ein Puls. Dies soll im Folgenden mit Hilfe eines Amplitudenmodulators erläutert werden. Wenn eine Frequenz  $f_0$  im Resonator mit der Frequenz  $f_M$  moduliert wird, bilden sich daraus zunächst die Frequenzen  $f_0 + f_M$  und  $f_0 - f_M$ . Diese Seitenbänder werden im nächsten Schritt selbst moduliert. Die Folge ist, dass die Frequenzen

$$f = f_0 \pm n f_M \quad (2.32)$$

generiert werden, wobei  $n$  eine natürliche Zahl ist.

Die kleinste Frequenz, die in einem Resonator mit der Länge  $L$  anschwingen kann, hat eine Wellenlänge von  $\lambda = c/2L$  was auch als freier Spektralbereich (FSR, engl.: Free Spectral Range) bezeichnet wird. Alle weiteren anschwingenden Frequenzen müssen folglich ein Vielfaches dieser Wellenlänge sein. Daraus ergibt sich

$$f = \frac{cm}{2L} \quad (2.33)$$

als Frequenzbedingung für den Resonator, wobei  $m$  eine natürliche Zahl ist. Wird nun als Modulationsfrequenz entsprechend  $c/2L$  gewählt, schwingen alle generierten Frequenzen in Phase zueinander. Das Spektrum an Frequenzen ist technisch im Allgemeinen begrenzt, was über das Verstärkungsprofil  $\Delta f$  ausgedrückt wird. Die Anzahl anschwingender Frequenzen wird zusätzlich dadurch limitiert, dass jedes Lasersystem eine energetische Laserschwelle hat, unterhalb derer sich die jeweiligen Frequenzen nicht aufbauen können. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 2.9 illustriert.

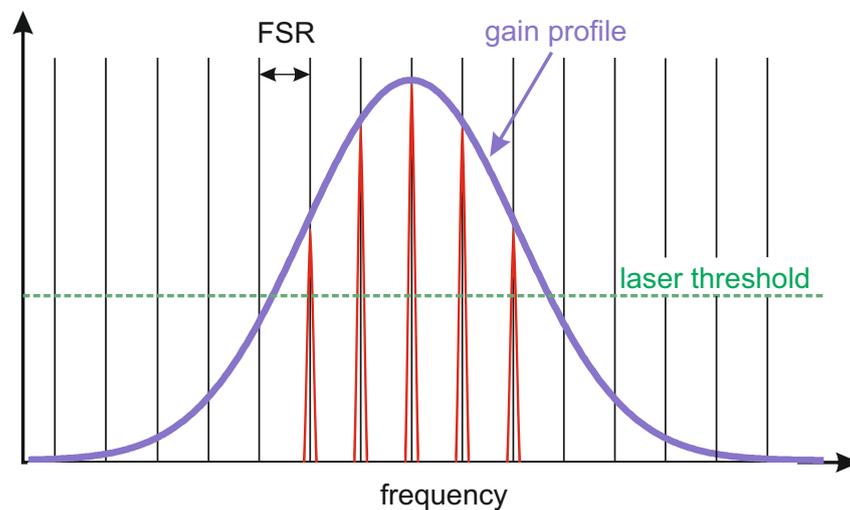


Abbildung 2.9: Darstellung der anschwingenden Moden in einem Resonator. Die schwarzen, äquidistanten Linien geben die theoretisch möglichen Resonanzen der Kavität wieder und die lilafarbene Kurve zeigt den Verlauf des Verstärkungsspektrums des aktiven Mediums. Die tatsächlich anschwingenden Frequenzen sind rot dargestellt.

Die Anzahl  $N$  dieser Frequenzen lässt sich approximativ über

$$N \approx \frac{\Delta f}{f_M} \quad (2.34)$$

bestimmen. Wird angenommen, dass jede einzelne Mode gleichermaßen verstärkt werde und eine Amplitude von  $A_0$  habe, dann lässt sich folgender einfacher Ausdruck für die Gesamtamplitude aller Moden gewinnen:

$$A = \sum_{j=-k}^{j=+k} A_0 \cos 2\pi(f_0 + jf_M)t. \quad (2.35)$$

Bei  $N$  Moden muss  $N = 2j + 1$  gelten. Die Gesamtintensität  $I(t)$  bildet sich schließlich aus dem Quadrat dieser Amplitude. Damit lässt sich zeigen, dass

$$I(t) \propto A_0^2 \frac{\sin^2 N\pi f_M t}{\sin^2 \pi f_M t} \cos 2\pi f_0 t \quad (2.36)$$

gilt. In Abbildung 2.10 ist dieser Intensitätsverlauf für  $N = 5$  und  $N = 25$  exemplarisch dargestellt. Es zeigt sich, dass die zeitliche Breite des Pulses mit zunehmender Modenanzahl kürzer wird. Die Repetitionsrate ist limitiert durch den freien Spektralbereich.

### Passive Modenkopplung

Ein Laser kann auch ohne extern gesteuerte Elektronik im Pulsbetrieb betrieben werden. Dazu werden zum Beispiel sättigbare Absorber eingesetzt. Diese haben die Eigenschaft, dass sie ab einer gewissen Intensität des darin absorbierten Lichtes transparent werden. Eine Pulsbildung kommt nun folgendermaßen zu Stande:

Zu Beginn propagieren Photonen im Resonator, die durch spontane Emission vom aktiven Medium emittiert wurden. Diese haben zunächst keine Phasenbeziehung zueinander. Die Photonendichte ist zeitlich inhomogen. Der sättigbare Absorber absorbiert Ansammlungen vieler Photonen weniger effizient als Bereiche einzelner Photonen. Demzufolge erreichen nur Bereiche höherer Photonendichten nach einem Umlauf wieder das aktive Medium. Nur diese verstärken sich durch stimulierte Emission. Dieser Prozess wiederholt sich in der Form, dass wieder nur hohe Intensitäten durch den

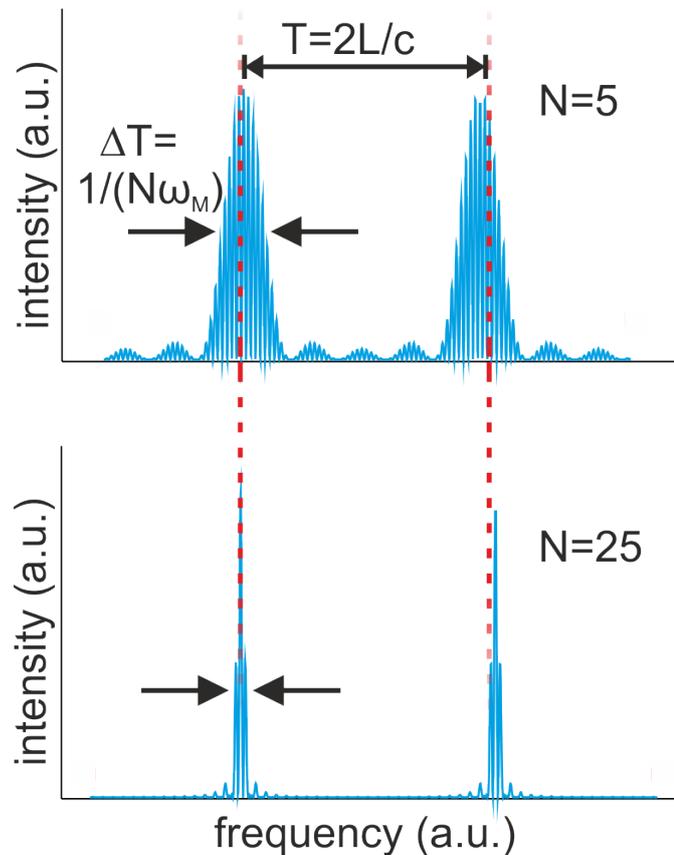


Abbildung 2.10: Berechnung der Modenkopplung von 5 (oberes Bild) beziehungsweise 25 (unteres Bild) Moden. Dargestellt ist der daraus resultierende Intensitätsverlauf. Die roten Linien geben die Orte der Maxima an. Die Distanz zwischen diesen beiden Linien entspricht der Umlaufzeit des Resonators mit der Länge  $L$ . Der Kehrwert dieser Zeit ergibt die Repetitionsrate der sich bildenden Pulse, deren zeitliche Breite mit wachsender Modenzahl schmaler wird. Folglich wächst damit einhergehend die Intensität des Pulses ebenfalls an.

sättigbaren Absorber verlustarm transmittieren, um sich anschließend wieder zu verstärken. Die Folge ist, dass sich nach hinreichend vielen Umläufen ein intensiver Puls in der Kavität bildet. Dieser Puls wird durch diesen Prozess immer stärker zeitlich gekürzt, da seine Flanken aufgrund ihrer geringeren Intensität höhere Verluste haben als die intensive Pulsmitte. Der limitierende Faktor für diesen Kürzungsprozess ist letztlich materialspezifisch die Schnelligkeit der Sättigung in der Absorption.

Dieses Prinzip der passiven Modenkopplung kann auch über den Prozess der Selbstfokussierung erreicht werden, der Kerr-Linsen-Effekt genannt wird.

Dieser ist ein  $\chi^{(3)}$ -Prozess und tritt deshalb nur bei hohen Intensitäten auf. Die Polarisation dritter Ordnung  $P^{(3)}$  ist abhängig vom Betragsquadrat des elektrischen Feldes und damit der Intensität. Wenn als elektrisches Feld eine in  $z$ -Richtung propagierende Welle der Kreisfrequenz  $\omega$  und einer Amplitude von  $E_0$  angenommen wird, so folgt daraus

$$P^{(3)} = \epsilon_0 \chi^{(3)} E^3 = \epsilon_0 \chi^{(3)} (E_0^3 e^{3i(\omega t - kz)} + 3E_0 |E_0|^2 e^{i(\omega t - kz)} + c.c.). \quad (2.37)$$

Wird dies in die Wellengleichung 2.20 eingesetzt, ergibt sich

$$-k^2 + n_0^2 \frac{\omega^2}{c_0^2} = -3\chi^{(3)} |E_0|^2 \frac{\omega^2}{c_0^2}. \quad (2.38)$$

$n_0$  steht für den linearen Brechungsindex. An dieser Stelle wird nun ein allgemeiner, nichtlinearer Brechungsindex  $n$  eingeführt, der formal diesem Ausdruck die gleiche Gestalt gibt wie die Lösung der linearen Wellengleichung:

$$n^2 = n_0^2 + 3\chi^{(3)} |E_0|^2 = n_0^2 + \frac{6\chi^{(3)}}{c_0 \epsilon_0} I = n_0^2 + 2n_0 n_2 I \quad (2.39)$$

mit der Intensität  $I = \frac{1}{2} c_0 \epsilon_0 |E_0|^2$ . Die meisten Materialien weisen einen sehr kleinen Wert für  $n_2$  auf, sodass dessen Quadrat vernachlässigbar klein wird. Daraus lässt sich  $n$  nähern zu

$$n = n_0 + n_2 I. \quad (2.40)$$

Dieser intensitätsabhängige Brechungsindex ist verantwortlich für zwei wichtige Effekte: Die Selbstphasenmodulation und der Kerr-Effekt.

Im Folgenden sei ein Puls mit einer spektralen Breite von  $\Delta\omega$  und einem gaußförmigen, zeitlichen Intensitätsverlauf  $I(t)$  angenommen. Die Phase des elektrischen Feldes ist mit Gleichung 2.40:

$$\phi = \omega t - kz = \omega_0 t - zn_0 \frac{\omega_0}{c} - zn_2 \frac{\omega_0}{c} I(t). \quad (2.41)$$

Die Zentralfrequenz des Pulses wird hier  $\omega_0$  bezeichnet. Die Momentanfrequenz erhält man nun über die zeitliche Ableitung der Phase:

$$\omega(t) = \frac{d\phi}{dt} = \omega_0 - zn_2 \frac{\omega_0}{c} \frac{d}{dt} I(t). \quad (2.42)$$

Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, dass die Momentanfrequenz direkt von der Änderung der Pulsintensität abhängt. Während des Pulsanstieges ( $dI/dt > 0$ ) wird die Frequenz rotverschoben, während sie in der Abklingphase ( $dI/dt < 0$ ) zu höheren Frequenzen schiebt. Das hat zur Folge, dass der gesamte Puls spektral an Breite gewinnt. Diesen Effekt der Selbstphasenmodulation wird verwendet, um einen Puls zeitlich zu komprimieren, indem er spektral verbreitert wird und anschließend beispielsweise mit einem Gitterpaar oder einem Prismensystem die spektralen Komponenten wieder zeitlich zusammengeführt werden. Abbildung 2.11 veranschaulicht diesen Effekt der spektralen Verbreiterung.

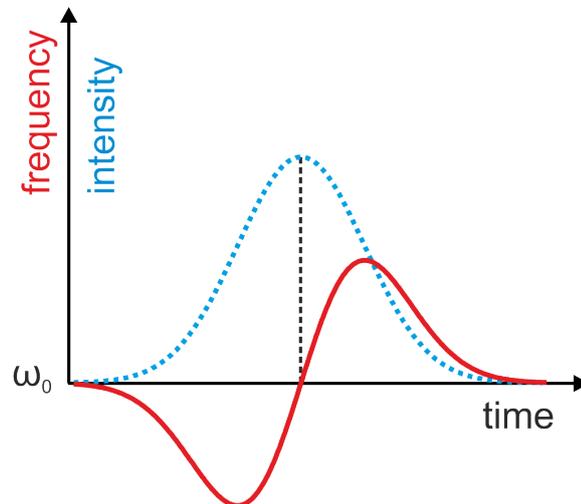


Abbildung 2.11: Veranschaulichung des spektralen Verbreiterungseffektes über die Selbstphasenmodulation. Es wird ein gaußförmiger Puls angenommen mit einer zentralen Frequenz von  $\omega_0$ . Der zeitliche Verlauf der Intensität des Pulses ist blau gestrichelt illustriert. Der resultierende Frequenzversatz ist schematisch in rot dargestellt.

Zum Kerr-Effekt: Ein gaußförmiger Laserpuls, der durch ein nichtlineares Medium propagiert, hat eine radialsymmetrische Intensitätsverteilung senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Folglich erfährt der Puls gemäß Gleichung 2.40 eine entsprechende Abhängigkeit im Brechungsindex. Die physikalische Wirkung dieses Sachverhaltes ist die gleiche wie die Propagation durch eine Linse: Der Laserpuls fokussiert sich selbst. Insofern wird dieser Effekt auch Kerr-Linsen-Effekt genannt.

Ein Laserpuls schwacher Intensität wird somit schwächer fokussiert als ein

intensiver Laserpuls. Wird nun hinter einem Kristall, der diesen Effekt der Selbstfokussierung auslöst, eine Blende gestellt, können nur Laserpulse höchster Intensität diese passieren. Die Folge ist die gleiche wie die eines sättigbaren Absorbers: schwache Intensitätsbereiche werden absorbiert und nur die Spitzenintensitäten werden verstärkt.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der aktiven Modenkopplung ist die, dass der beschriebene Effekt nahezu instantan geschieht. Die Effizienz in der Pulsbildung mittels eines Amplitudenmodulators hingegen ist durch die Elektronik eingeschränkt. Aus diesem Grunde gelingt es über Kerr-Linsen-Modenkopplung, Pulse von einigen Femtosekunden zu formen, während die zeitliche Untergrenze der Pulsdauer bei aktiver Modenkopplung im Pikosekundenbereich liegt.

Eine weitere, speziell bei Faserlasern sehr wichtige Methode, ist die der additiven Puls-Modenkopplung (APM). Diese beruht auf dem Effekt der intensitätsabhängigen Polarisation von Licht in Kristallen. Der Peak eines sich bildenden Pulses erfährt eine andere Polarisationsänderung als seine weniger intensiven Flanken. Mittels einer Anordnung von  $\lambda/2$  und  $\lambda/4$  Platten ist es nun möglich, entsprechend polarisationsselektiv diesen Puls zu verstärken beziehungsweise zu absorbieren.

### 2.2.3 Die Femtosekundenlaserquelle

Für die ultraschnellen Absorptionsmessungen im UV-Vis-Bereich in dieser Arbeit wurde das Lasersystem CPA-iSeries (Clark, MXRCPA-iSeries) verwendet und für Messungen im infraroten Detektionsbereich kam das Lasersystem CPA2001 (Clark, MXRCPA-2001) zum Einsatz. Beide Laser generieren Pulse bei einer zentralen Wellenlänge von 775 nm und einer Pulsenergie von etwa 800 nJ. Die Pulsdauer beträgt in beiden Fällen etwa 170 fs bei einer Repetitionsrate von 1 kHz. Der CPA2001 und der CPA-iSeries unterscheiden sich in der Funktionsweise nicht. Im Folgenden soll diese Funktionsweise skizziert werden. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 2.12 illustriert.

Die Erzeugung ultrakurzer, intensiver Pulse beruht auf der Verstärkung zeitlich gedehnter Pulse (engl.: Chirped Pulse Amplification, CPA). Dieser Prozess findet im regenerativen Verstärker statt, welcher im Wesentlichen aus einer  $z$ -Kavität mit einem darin integrierten  $\text{Ti}^{3+}$  dotierten Saphir-Kristall

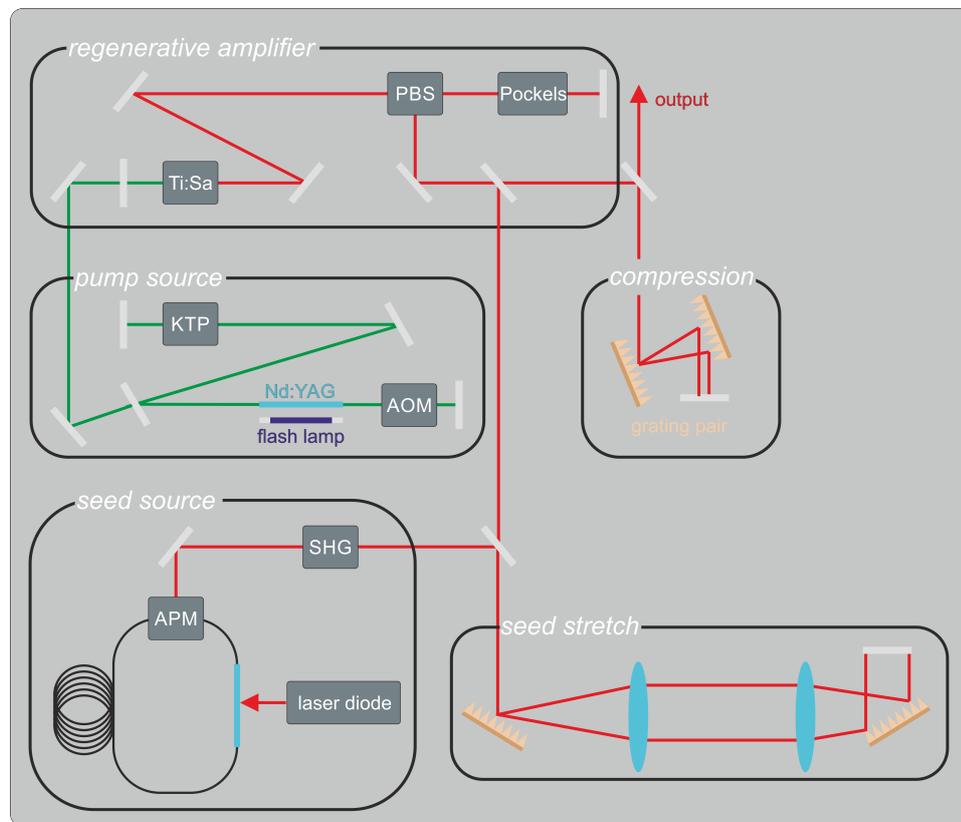


Abbildung 2.12: Aufbauprinzip des CPA-Lasers. Abkürzungen: PBS (Polarizing Beam Splitter), KTP (Kaliumtitanylphosphat), AOM (AkustoOptischer Modulator), SHG (Second Harmonic Generation), APM (Additive Pulse Modelocking)

(Ti:Sa) besteht. Der Kristall absorbiert im grünen Spektralbereich und emittiert Licht zwischen 600 und 1100 nm. Das zeitlich gestreckte Seedlicht hat eine zentrale Wellenlänge von 775 nm und eine Pulsdauer von 200 ps. Dieses wird im Ti:Sa-Kristall verstärkt, während dieser durch einen Nd:YAG-Laser optisch gepumpt wird. Die Auskopplung wird mit einer Pockelszelle in Kombination mit einem polarisierenden Strahlteiler (PBS; engl.: Polarizing Beamsplitter) gesteuert und bewirkt eine Taktrate von 1 kHz. Nach Austritt der verstärkten Pulse aus der Kavität werden diese über einen Gitterkompressor auf etwa 170 fs zeitlich gekürzt.

Der Pumpimpuls für den regenerativen Verstärker wird mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser generiert. Der Nd:YAG Stab selbst wird mit einer Blitzlampe zur Besetzungsinversion gebracht. Dies führt zu einem Laserprozess bei 1064 nm. Ein KTP-Kristall (Kaliumtitanylphosphat) im Resonator

generiert über SHG die Frequenzverdoppelte dieses Signals. Der Pump-laser ist über einen akustooptischen Modulator gütegeschaltet, sodass dieses System schließlich 532 nm-Pulse mit einer Pulsdauer von 200 ns und einer Leistung von etwa 7 W dem regenerativen Verstärker zur Anregung des Ti:Sa-Kristalls zur Verfügung stellt.

Der Seedpuls wird über eine Kombination von einem Faseroszillator, einer Laserdiode und einem SHG-Kristall generiert. Der Faseroszillator besteht im Wesentlichen aus einer  $\text{Er}^{3+}$ -dotierten Faser, die über eine 980 nm-Laserdiode gepumpt wird und Licht mit einer zentralen Wellenlänge von 1550 nm emittiert. Der Faseroszillator generiert ultrakurze Pulse über additive Puls-Modenkopplung. Nach Austritt aus diesem System werden diese Pulse in einem PPLN-Kristall (engl.: Periodically Poled Lithium Niobate; dt.: Periodisch gepoltes Litiumniobat) auf 775 nm frequenzverdoppelt. Bevor diese Pulse schließlich als Seedpulse im regenerativen Verstärker fungieren können, werden sie über eine Gitteranordnung zeitlich gestreckt.

#### 2.2.4 Der UV-Vis-Messaufbau

In diesem Kapitel wird der Messaufbau der ATAS (engl.: Advanced Transient Absorption Spectroscopy) erläutert. An dieser Messapparatur können ultraschnelle, lichtgesteuerte Photodynamiken gemessen werden. Es wird die transiente Absorptionsänderung einer Probe mit einer Zeitauflösung von bis zu 30 fs im sichtbaren Bereich detektiert. Die maximal messbare Verzögerungszeit nach der optischen Anregung der Probe liegt bei etwa 2 ns. Eine schematische Darstellung dieser Anlage ist in Abbildung 2.13 gegeben. Der zeitliche Versatz zwischen dem Anregungspuls (Pump) und dem Abfragepuls (Probe) wird über eine Verzögerungsstrecke generiert: Wenn beispielsweise die Absorptionsänderung nach 1 ps gemessen werden soll, dann wird der Strahlverlauf des Pumps so modifiziert, dass dieser 300  $\mu\text{m}$  mehr Strecke zu durchlaufen hat, bis er auf die zu untersuchende Probe trifft. Dies wird über einen motorisierten Verzögerungsschlitten technisch umgesetzt und ist in Abbildung 2.13 mit einem blauen Pfeil schematisch dargestellt.

Die Anregung wird, je nach gewünschter Wellenlänge, über mehrere Stufen generiert. Zunächst wird über einen NOPA eine Frequenz generiert, des-

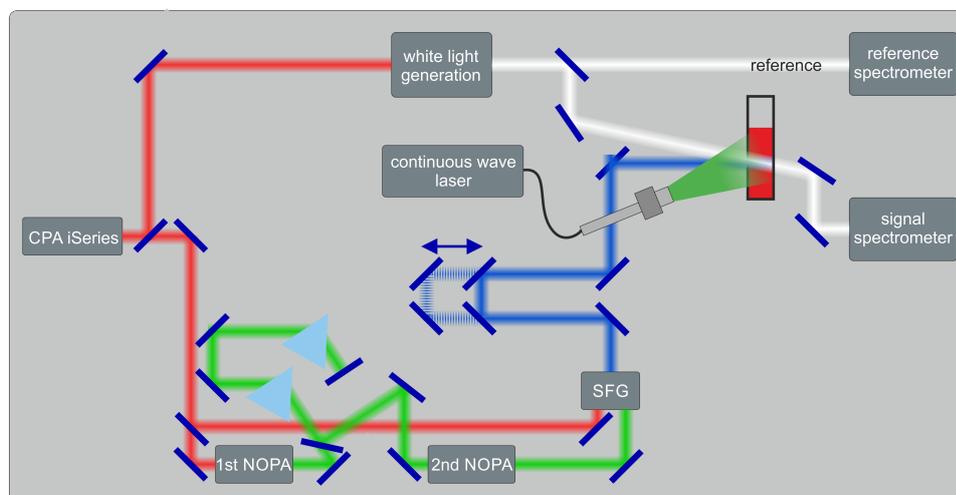


Abbildung 2.13: Messaufbau der ATAS (Details siehe Text).

sen Intensität in einem zweiten NOPA verstärkt wird. Danach durchläuft der Strahl optional einen weiteren Kristall, in dem über Summenfrequenzerzeugung UV-Pulse generiert werden. Diese durchlaufen anschließend den Verzögerungsschlitten, um schließlich über einen Parabolspiegel in die zu untersuchende Probe fokussiert zu werden.

Da der Puls aufgrund von normaler Dispersion während der Propagation im Aufbau zeitlich auseinanderläuft, ist zwischen dem ersten und zweiten NOPA ein Prismenkompressor installiert, der bei angepasster Prismendistanz und Prismeneindringtiefe dafür Sorge trägt, dass der Puls möglichst kurz am Ort der Probe ist.

Das Superkontinuumsweißlicht wird parallel zur Generierung des Anregelichtes in einem wahlweise  $\text{CaF}_2$  oder  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Saphir) Kristall erzeugt. Dieses wird mit einem Strahlteiler zu zwei Pulsen zerlegt. Eines fällt direkt spektral aufgelöst auf einen Detektor und der andere transmittiert durch das Anregungsvolumen der Probe. Danach wird dieses Licht ebenfalls spektral aufgelöst in einem baugleichen Detektor gemessen. Dieser besteht aus einem Gitter und einem Photodiodenarray (AMKO Multimode). Das Spektrum des  $\text{CaF}_2$ -Weißlichts erstreckt sich von etwa 350 nm bis 750 nm, während das Saphir-Weißlicht seine kurzwellige Grenze bei etwa 450 nm hat. Vorteil beim Saphir-Kristall ist allerdings, dass dieser stabileres Weißlicht generiert als das  $\text{CaF}_2$ .

Zusätzlich lässt sich die Probe mit einem Dauerstrichlaser oder einer LED-

Lampe (engl.: Light Emitting Diode) beleuchten. Dazu ist ein Glasfaser-  
ausgang vor der Probe angebracht, um die zu untersuchende Probe zu be-  
leuchten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der VERDI-5W-Laser (Coherent)  
verwendet, der bei 532 nm intensives Laserlicht emittiert.

Um die Polarisation zwischen dem Anrege- und Abfragepuls variieren zu  
können, transmittiert der Abfragepuls vor Eintritt in die Probe durch ei-  
ne  $\lambda/2$ -Platte. Diese ist in allen Experimenten dieser Arbeit so eingestellt,  
dass die Polarisierungen im magischen Winkel von  $54,7^\circ$  zueinander stehen,  
was bewirkt, dass rotationsbedingte Dynamiken minimiert werden. Für die  
Messung eines Differenzsignals muss die Absorption sowohl der optisch an-  
geregten Probe als auch der unangeregten Probe gemessen werden. Um das  
Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wird in einem dritten Schritt das  
Streulicht des Anregelichtes gemessen (siehe Abbildung 2.14).

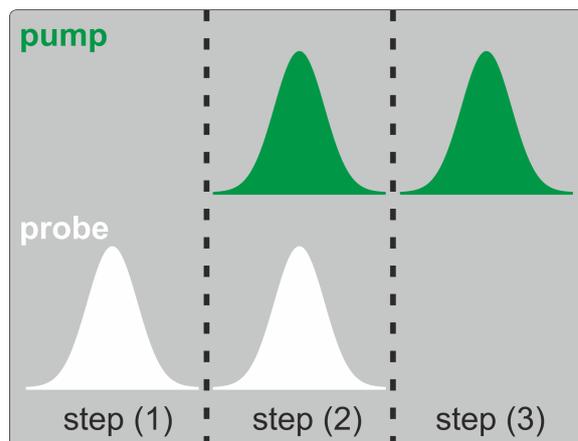


Abbildung 2.14: 3-stufige Messweise an der ATAS.

Die Detektion der Absorptionsänderung zu einer Verzögerungszeit erfordert  
folglich drei Signale. Da in jedem dieser Messschritte zwei Detektoren invol-  
viert sind, um neben dem transmittierten Licht auch das Spektrum des Weiß-  
lichts als solches zur Referenzierung zu erhalten, sind demnach sechs Signa-  
le miteinander zu verrechnen. In Tabelle 2.1 sind alle zu berücksichtigende  
Messsignale aufgelistet.

Die Berechnung von Absorptionsänderung  $\Delta A$  erfolgt in folgender Weise:

Bezeichnung	Detektor	Messschritt
$I_{0,ref}$	Referenz	(1)
$I_0$	Signal	(1)
$I_{ref}$	Referenz	(2)
$I$	Signal	(2)
$I_{St,ref}$	Referenz	(3)
$I_{St}$	Signal	(3)
$I_{Du,ref}$	Referenz	vor Messbeginn
$I_{Du}$	Signal	vor Messbeginn

Tabelle 2.1: Die Schritte beziehen sich auf Abbildung 2.14. Index  $Du$  steht für Dunkelstrom.

$$\Delta A = -\log \frac{\left( \frac{I - I_{Du} - (I_{St} - I_{Du})}{I_{ref} - I_{Du,ref} - (I_{St,ref} - I_{Du,ref})} \right)}{\left( \frac{I_0 - I_{Du}}{I_{0,ref} - I_{Du,ref}} \right)}$$

$$= -\log \left( \frac{I - I_{St}}{I_{ref} - I_{St,ref}} \frac{I_{0,ref} - I_{Du,ref}}{I_0 - I_{Du}} \right).$$

Von jedem Messsignal wird vorher die Dunkelstrommessung abgezogen und jedes Spektrum wird geteilt durch das entsprechende Spektrum vom Referenzdetektor.

### 2.2.5 Der MIR-Messaufbau

Für eine analoge Ultrakurzzeitmessung im mittleren Infrarotbereich wurde eine Anlage von Karsten Neumann aufgebaut und im Detail in seiner Dissertation beschrieben[39]. Das Experiment ist in Abbildung 2.15 schematisch skizziert.

Der Anregepuls wird über mehrere Stufen erzeugt. Im ersten Schritt wird die Frequenzverdoppelte der Fundamentalen des CPA-Lasers generiert. Danach kann mit dem SHG-Puls und einem Weißlichtpuls eine Zielfrequenz über den NOPA generiert werden. Optional wird diese wiederum in einem dritten Schritt zusammen mit der Fundamentalen genutzt, um über Summenfrequenz einen kurzwelligen Puls zu erzeugen. Folglich lässt sich zwischen einem SHG-, NOPA- oder SFG-Puls als Anregung wählen. Dieser wird schließlich

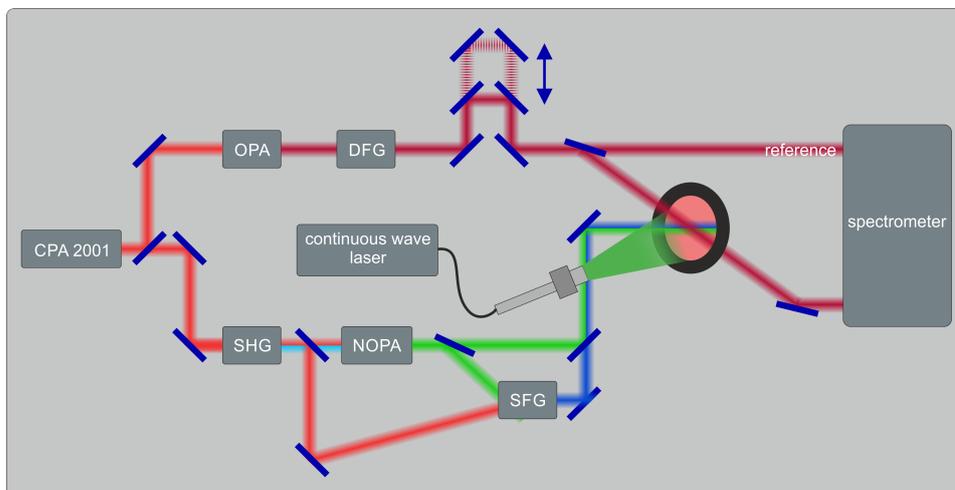


Abbildung 2.15: Messaufbau der IRMA (Details siehe Referenz [39]).

über einen Parabolspiegel auf die Probe fokussiert.

Das IR-Abfragelicht wird über zwei Prozesse generiert: Die Laserfundamentele konvertiert zu einem Seed- und Idlerpuls in einem zweistufigen kollinearen optisch parametrischen Verstärker. Dies geschieht mit einem BBO-Kristall über Typ II-Phasenanpassung. Danach wird die Differenzfrequenz dieser beiden Pulse in einem  $\text{AgGaS}_2$ -Kristall generiert. Ein Germaniumfilter befreit diesen IR-Puls von Resten des Seed- und Idlerlichtes. Anschließend durchläuft der Puls einen Verzögerungsschlitten. Bevor schließlich der Puls über Goldspiegel auf das Anregungsvolumen der Probe fokussiert wird, wird ein Teil des Pulses über einen Strahlteiler abgesondert und direkt in den Detektor geführt. Der andere Pulsteil wird nach Transmission durch die Probe ebenfalls im gleichen Spektrometer spektral aufgelöst gemessen. Das Abfragelicht ist über die Verkippung des DFG- und OPA-Kristalls von 3 bis  $10\ \mu\text{m}$  durchstimmbare.

Zur Detektion wird ein 32-Kanal MCT (engl.: Mercury Cadmium Telluride) Detektor verwendet, der aus dem Halbleitermaterial  $\text{HgTe-CdTe}$  besteht und mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden allerdings ohne Verwendung der Referenzkanäle durchgeführt. Das Abfragelicht wird ab seiner Erzeugung im DFG-Kristall bis zu seiner Detektion in einem geschlossenen Kasten geführt, der mit Trockenluft gespült wird. Dies reduziert den stark IR-absorbierenden Wasseranteil in der Luft, was die Stabilität und Intensität des Lichtes erheblich verbessert.

Genau wie im Ultrakurzzeitexperiment im sichtbaren Bereich, ist auch hier der Einsatz von einem Dauerstrichlaser oder einer LED-Lampe möglich, um die Probe bei Bedarf während der Messung kontinuierlich zu beleuchten.

## 2.3 Kinetische Analyse transienter Daten

Die kinetische Analyse von transienten Absorptionsmessungen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit dem Programm OPTIMUS[40], von dem zwei verschiedene Analyseverfahren genutzt wurden. Diese werden in diesem Abschnitt vorgestellt. Eine detaillierte Beschreibung ist in Referenz [40] zu finden.

Bevor allerdings eine kinetische Auswertung erfolgen kann, muss der transiente Datensatz von Artefakten befreit werden. So ist zunächst eine Nullpunktskorrektur vorzunehmen, da unterschiedliche Spektralkomponenten des Abfragelichtes zu unterschiedlichen Zeiten auf den Detektor auftreffen, was auf den Chirp des Weißlichts zurückzuführen ist. Außerdem muss dafür Sorge getragen werden, dass die transienten Datensätze von kohärenten Artefakten befreit werden. Denn um den Nullpunkt herum überlappen der Abfrage- und Anregepuls zeitlich und räumlich, was aufgrund hoher Intensitäten zu Kreuzphasenmodulation führt. Eine Möglichkeit diesen Effekt zu kompensieren, ist eine erneute Messung unter möglichst gleichen Bedingungen nur mit reinem Lösungsmittel, in welchem keine Photodynamik induziert werden kann. Dieses Messartefakt kann dann bei angepasster Skalierung von den Daten der Probenmessung abgezogen werden.

### 2.3.1 Globale Lebensdaueranalyse

Die Globale Lebensdaueranalyse (GLA) ist ein modellabhängiges Verfahren. Ein transienter Datensatz  $S(\lambda, t)$  wird hierbei über eine diskrete Summe von exponentiellen Termen vereinfacht beschrieben:

$$S(\lambda, t) = \sum_{j=1}^n A_j(\lambda, \tau_j) \exp(-t/\tau_j) \quad (2.43)$$

Die Fitparameter sind eine vom Nutzer zu bestimmende Anzahl  $n$  an Lebensdauern  $\tau$ . Dabei werden die jeweiligen Vorfaktoren  $A(\lambda, t)$  der expo-

entiellen Funktionen an den Messdatensatz angepasst. Diese Amplituden lassen sich spektral aufgelöst für jede Lebensdauer als sogenannte zerfallsasoziierte Spektren (DAS; engl.: Decay Associated Spectra) auftragen.

### 2.3.2 Lebensdauerdichteanalyse

Im Gegensatz zur GLA-Analyse ist die Lebensdauerdichteanalyse (LDA, engl.: Lifetime Density Analysis) modellunabhängig. Das heißt, dass keine fixe Anzahl an exponentiellen Funktionen herangezogen wird. Stattdessen wird eine kontinuierliche Verteilung von Exponentialfunktionen angesetzt:

$$S(\lambda, t) = \int_0^{\infty} \Psi(\lambda, \tau) \exp(-t/\tau) d\tau \quad (2.44)$$

Mathematisch ausgedrückt ist der Messdatensatz  $S(\lambda, t)$  die Laplace-Transformierte von der Dichtefunktion  $\Psi(\lambda, \tau)$ . Aus numerischen Gründen wird dieses Integral bei den computerbasierten Kalkulationen allerdings in eine quasikontinuierliche Summe übersetzt. Um die Dichtefunktion zu bestimmen, muss eine inverse Laplace-Transformation durchgeführt werden. Dieser Schritt ist nicht trivial, da bereits schwaches Rauschen in den Messdaten zu künstlichen Oszillationen führen kann, die mit der zu untersuchenden molekularen Dynamik nicht korreliert sind. Insofern muss die Transformation regularisiert werden, um stabile numerische Lösungen zu erhalten[41]. Welcher Regularisierungsfaktor (genannt  $\alpha$ ) letztlich bei der Analyse einzustellen ist, muss individuell je nach Datensatz und Datenqualität entschieden werden. Wird  $\alpha$  zu hoch eingestellt, werden die transienten Daten nicht gefittet und man erhält eine große Residuenmatrix. Im umgekehrten Falle, bei zu klein gewähltem  $\alpha$ , werden die Messungen überinterpretiert und jedes Rauschen wird kinetisch analysiert, während die Residuenmatrix verschwindend klein wird.

Einen Anhaltspunkt für eine sinnvolle Abschätzung des Regularisierungsfaktors bietet das sogenannte L-Kurven-Kriterium. Die L-Kurve ist eine doppelt-logarithmische Auftragung von einer Größe, die  $\alpha$ -korreliert den Glättungsgrad widerspiegelt, gegen den Residuenfaktor des Fits. Typischerweise zeigt diese Kurve einen L-förmigen Verlauf, in der im Knick-Bereich der optimale Regularisierungsfaktor gefunden werden kann.

Sobald ein sinnvoller Wert für die Regularisierung schließlich gefunden ist,

liefert die LDA-Analyse mit der Bestimmung der Dichtefunktionen  $\Psi(\lambda, \tau)$  spektral aufgelöste Verteilungen von Lebensdichten. Diese werden oft Lebensdichtekarten (LDM, engl.: Lifetime Density Map) genannt.

Vorteil der LDA-Analyse ist, dass es auch gestreckte und nicht-exponentielle Dynamiken komplexer Kinetiken berücksichtigt.

## Kapitel 3

# Proteorhodopsin

Proteorhodopsin (PR) wurde im Jahre 2000 im  $\gamma$ -Proteobakterium in der Monterey Bay (Kalifornien, USA) entdeckt [28, 29]. Es stellt das erste bekannte bakterielle Rhodopsin dar. Ähnliche Retinalproteine sind auch in eukaryotischen Lebensformen [21, 42] und in Archaeen [17, 43–45] entdeckt worden. All diese Systeme haben gemeinsam, dass ihre Tertiärstrukturen aus sieben Transmembranhelices bestehen, an denen an einem Lysin ein Retinal als Chromophor kovalent gebunden ist. Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche PR-Varianten in Ozeanen, Seen, auf Bergen und selbst im sibirischen Permafrost gefunden [46–52].

PR agiert als lichtgetriebene Protonenpumpe. Diese Eigenschaft wird von Organismen als Energiequelle genutzt, was als Phototrophie bezeichnet wird [29]. Die Nutzung dieser photonischen Energie ist vielfältig. Teilweise wird sie direkt für den Stoffwechsel genutzt oder für die Fortbewegung über Flagellen [53, 54]. Das Flavobakterium *Dokdonia* sp. MED134 weist ein lichtstimuliertes Wachstumsverhalten auf, was auf die Anwesenheit von PR zurückgeführt wird [55]. Außerdem wird diesem Retinalprotein zumindest in einem Fall (*Oxyrrhis marina*) eine photosensorische Funktion für Dinoflagellate zugesprochen [56]. Die wohl wichtigste physiologische Funktion von PR ist die der chemischen Energiegewinnung. Dabei wird die photonische Energie genutzt, um Adenosinriphosphat (ATP) als Energieträger zu synthetisieren. Die marinen Spezies lassen sich durch ihre Absorptionscharakteristik klassifizieren: Es gibt grün absorbierende (GPRs) und blau absorbierende Proteorhodopsine (BPRs) [57, 58]. GPRs sind vorwiegend in den euphotischen

Meereszonen vorzufinden, während sich BPRs vermehrt in tieferen Meeresregionen befinden. Dies lässt sich darüber erklären, dass die spektrale Verteilung des Sonnenlichts bedingt durch die Absorptionseigenschaften von Wasser in zunehmender Meerestiefe blauverschoben ist.

### 3.1 Struktur und Funktionsweise von Proteorhodopsin

GPR verfügt, verglichen mit BPR, über eine wesentlich höhere Protonenpumpaktivität [57]. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit Bakteriorhodopsin (BR) zeigt außerdem, dass in GPR für den Protonentransport essentielle Aminosäuregruppen konserviert sind, während BPR in seiner Tertiärstruktur vergleichbarer mit Sensorrhodopsin II ist [58–61]. Aus diesen Gründen wird vermutet, dass GPR und BPR verschiedene physiologische Funktionen in der Natur übernehmen. GPR könnte vordergründig der Energiegewinnung dienen und BPR in der Sensorik eine Rolle spielen. Die meisten spektroskopischen Untersuchungen wurden an GPR durchgeführt, welches aus SAR-86 Proteobakterien exprimiert wird. Experimente im Bereich der Rasterkraftmikroskopie [62], Elektronenmikroskopie [63], Kernspinresonanzspektroskopie und der optischen Spektroskopie [60, 64–75] konnten zahlreiche strukturelle Informationen über die Helizes, das Retinal in der Retinalbindetasche, einzelne Aminosäuren und den vorwiegend hexameren und pentameren Oligomerisierungszustand liefern [63, 76–83]. Eine Struktur mit atomarer Auflösung steht bisher nur für BPR zur Verfügung [84]. Von GPR gibt es eine NMR (engl.: Nuclear Magnetic Resonance: NMR) Struktur [85] und Homologiemodelle in Bezug auf die Struktur von BR [60, 86]. Die NMR-Struktur ist in Abbildung 3.1 dargestellt [85].

Wie bereits erwähnt, sind die für den BR-Protonentransfer essentiellen Aminosäuren in GPR konserviert. Dazu zählt der Lysinrest, an dem das Retinal über eine Schiff'sche Base kovalent gebunden ist (BR: K216, GPR: K231), der primäre Protonenakzeptor (BR: D85, GPR: D97) und der primäre Protonendonator (BR: D96, GPR: E108) [67]. BR und GPR weisen außerdem hohe Ähnlichkeit in ihrer photochemischen und spektroskopischen Charak-

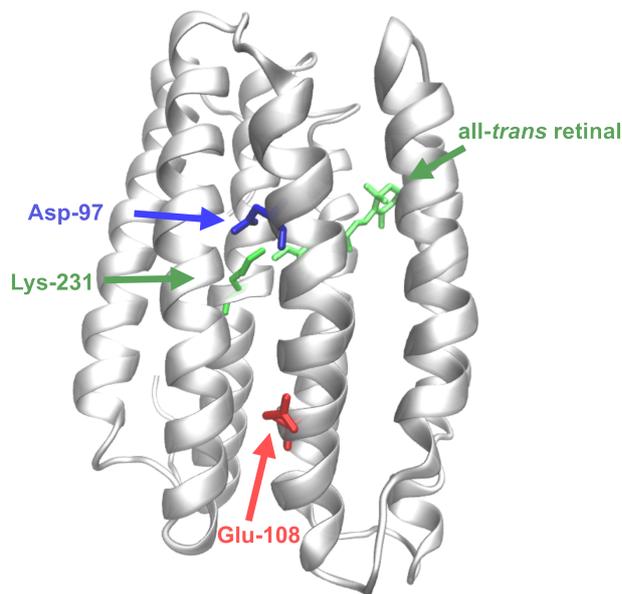


Abbildung 3.1: Die Struktur von grün absorbierendem Proteorhodopsin [85].

teristik [29, 57, 58, 60, 64, 87, 88] auf.

Ein Unterschied zeigt sich allerdings im Protonenfreisetzungskomplex. Diese aus zwei Aminosäuren bestehende Gruppe in BR (E194 und E204) [89–96] ist in GPR nicht konserviert. Der Vorgang der Protonenfreisetzung ist für GPR noch ungeklärt. Ein weiterer Unterschied zu BR liegt im Gleichgewicht von Retinalen im *all-trans* und *13-cis*-Isomerisierungszustand: In GPR liegt im Gegensatz zu BR das Retinal im Grundzustand fast ausschließlich in der *all-trans*-Konfiguration vor [71, 76].

Einer der wesentlichsten Unterschiede dieser beiden Protonenpumpen ist der  $pK_s$ -Wert der primären Protonenakzeptorreste: Während dieser für BR im sauren Bereich bei etwa pH 2 liegt [15, 97], ist der Wert für GPR stark alkalisch (7-8,5) [60, 67, 98, 99]. Grund für diesen hohen  $pK_s$ -Wert ist vermutlich ein Histidinrest (H75), welcher über die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu D97 den deprotonierten Zustand des Akzeptors stabilisiert [57, 61, 65, 77]. GPR ist unter alkalischen Bedingungen eine nach außen gerichtete Protonenpumpe: Protonen werden von der zytoplasmatischen Seite zum extrazellulären Raum transportiert. Studien basierend auf Tieftemperatur FTIR (engl., Fourier Transform Infrared), BLM-Elektrophysiologie an BR (engl., Black Lipid Membrane) und Fluoreszenz wiesen auf einen richtungsinvertierten Pumpvorgang unter sauren Bedingungen hin [74, 100, 101]. Andererseits

konnte ein invertierter Protonenpumpprozess unter aziden Bedingungen weder in Liposomen, noch in orientierten Membranfragmenten, noch in Sphaeroplasten nachgewiesen werden [67, 88]. Die Vektorialität des GPR in seiner Eigenschaft als Protonenpumpe ist daher noch ungeklärt. Im folgenden Unterkapitel wird die GPR-Photodynamik zunächst bei alkalischen Bedingungen und anschließend bei saurer Umgebung beschrieben.

### 3.2 Der Photozyklus von Proteorhodopsin

Die Primärreaktion ist die photoinduzierte Isomerisierung des Retinals. Dieses liegt im Grundzustand in der all-*trans*-Konfiguration vor und geht im Zuge der Lichteinwirkung zu 13-*cis* (K-Intermediat) über. Dieser Übergang lässt sich in vielen weiteren Retinalproteinen beobachten [102–105]. Die Photoisomerisierung ist in GPR nach einigen Pikosekunden abgeschlossen [66, 70, 74, 106–112]. Daraufhin erfolgt ein thermischer Prozess, der über die Bildung und den Zerfall von Intermediaten zur Rückbildung des Grundzustandes führt. Die nacheinander akkumulierenden und zerfallenden Intermediate werden K ( $\lambda_{max} \approx 560$  nm), M ( $\lambda_{max} \approx 400$  nm), N ( $\lambda_{max} \approx 590$  nm) und O ( $\lambda_{max} \approx 580$  nm) - in Anlehnung am Bakteriorhodopsinphotozyklus - genannt [113–115]. Ein vereinfachtes Schema des Verlaufs dieses Photozyklus ist in Abbildung 3.2 gegeben.

Nach der 13-*cis*-Photoisomerisierung (K-Intermediat) erfolgt die Deprotonierung der Schiff'schen Base. Dabei wird der primäre Protonenakzeptor D97 protoniert. Dieser Zustand wird als M-Intermediat bezeichnet. Anschließend wird die Schiff'sche Base über den primären Protonendonator E108 reprotoniert. Während des M-zu-N-Übergangs wird ein Proton zur extrazellulären Seite freigesetzt. Der vorletzte Schritt im Photozyklus ist die Bildung des O-Intermediats, in der das Retinal thermisch zur all-*trans*-Konfiguration zurückisomerisiert und der primäre Protonendonator E108 von der zytoplasmatischen Oberfläche protoniert wird. Schließlich kehrt GPR in den Grundzustand wieder zurück, indem der primäre Protonenakzeptor durch Protonenabgabe an die extrazelluläre Seite deprotoniert. Prinzipiell ist die Kinetik dieses Vorganges abhängig von verschiedenen Faktoren. Neben der Einstel-

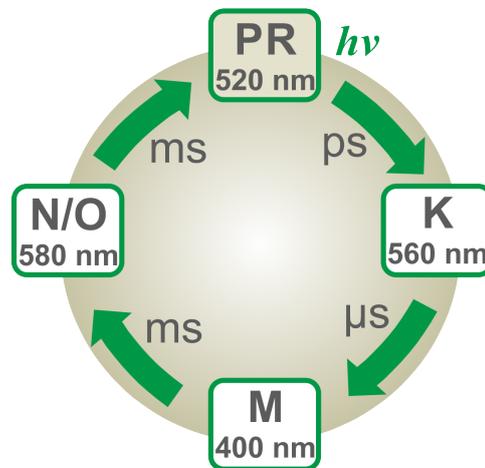


Abbildung 3.2: Schema des Photozyklus von Proteorhodopsin unter alkalischen Bedingungen.

lung des pH-Wertes, der Temperatur und des Gehaltes an Wasser, wirkt sich auch die Wahl des Detergens in solubilisierter Form oder die Wahl des Lipids in rekonstituierter Form auf die Photodynamik aus [116–119]. Die im Rahmen dieser Arbeit an GPR durchgeführten Experimente wurden ausschließlich in solubilisierter Präparationsweise unternommen. Das verwendete Detergens war DDM (DDM, engl.: n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside). In diesem Detergens wird der Zerfall vom K-Intermediat und der Aufbau vom M-Intermediat biexponentiell mit zwei Zeitkonstanten von  $7 \mu\text{s}$  und  $120 \mu\text{s}$  beobachtet [116, 120]. Der Abbau von M und damit die Akkumulation vom N/O-Zustand erfolgt ebenfalls mit zwei Zeitkonstanten:  $1,3 \text{ ms}$  und  $4,8 \text{ ms}$ . Die Kinetik von N lässt sich von der des O-Zustandes über optische Spektroskopie im sichtbaren Bereich nicht trennen, da deren spektrale Charakteristika zu ähnlich sind. Aus diesem Grund wird hier von einer N/O-Population gesprochen. Die Repopulation des Grundzustandes und damit einhergehend der Zerfall des N/O-Intermediates erfolgt schließlich ebenfalls biexponentiell mit den Zeitkonstanten  $72 \text{ ms}$  und  $310 \text{ ms}$ . Die hier beschriebene Kinetik beruht auf einer Datenanalyse von einem Blitzlichtphotolyseexperiment [116]. Die Analyse basiert auf einer Simulation der Daten mit einer Summe von zeitlich exponentiell erfolgenden Prozessen [40, 121].

Das Absorptionsmaximum von GPR verschiebt sich pH-abhängig von  $521 \text{ nm}$  (pH 9) zu  $536 \text{ nm}$  (pH 6)[108]. Ursache für diese spektrale Verschiebung ist der unterschiedliche Protonierungszustand des primären Protonenakzep-

tors ( $pK_S = 7,7$ )[122]:

Nur bei alkalischer Umgebung liegt der D97-Rest deprotoniert vor und beeinflusst in diesem Zustand als Gegenion zur protonierten Schiff'schen Base die Absorptionscharakteristik des Retinals.

Eine signifikante pH-abhängige Änderung in der Photodynamik von GPR betrifft die Bildung des M-Intermediats. Dessen Akkumulation wird im Sauren nur sehr schwach beobachtet, was auch eine schwach ausgeprägte Bildung der späten Intermediate N/O nach sich zieht [116].

### 3.3 Die Protonendonormutante E108Q

Eine Möglichkeit die Akkumulation von M signifikant zu erhöhen, ist es, den thermischen Reprotonierungsschritt der Schiff'schen Base zu verlangsamen. Der für die Reprotonierung entscheidende Aminosäurerest ist E108 und wird (wie bereits erwähnt) als primärer Protonendonor bezeichnet (D96 bei BR). Diese Eigenschaft als Protonendonor lässt sich nun über den Einbau einer neutralen Aminosäure anstatt der aziden Glutaminsäure deaktivieren. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit eignet sich für diesen Zweck Glutamin. Die Mutante E108Q sollte sich somit vordergründig nur im Reprotonierungsschritt, dem M-zu-N-Übergang vom Wildtyp unterscheiden. Tatsächlich wird beobachtet, dass die Lebensdauer des M-Intermediats in der GPR-E108Q-Mutante signifikant über mehrere Größenordnungen größer als die im Wildtyp ist [123]. Folglich ist auch die Photozyklusdauer deutlich verzögert [67]. Elektrophysiologische Experimente an dieser Mutante zeigten, dass die gemessenen Photoströme schwächer als die vom Wildtyp sind [101].

Die normierte Absorption des Grundzustands der GPR-E108Q-Mutante ist in Abbildung 3.3 dargestellt. In schwarz ist zusätzlich die (normierte) Grundzustandsabsorption des Wildtyps gegeben. Beide Proben wurden im gleichen Detergens und bei gleichem pH-Wert (8,5) gemessen. Das Absorptionsmaximum der Mutante ist um etwa 2,4 nm zu der des Wildtyps rotverschoben. Folglich nimmt der Austausch der Glutaminsäure an Position 108 mit der neutralen Aminosäure Glutamin geringen Einfluss auf die Absorptionscha-

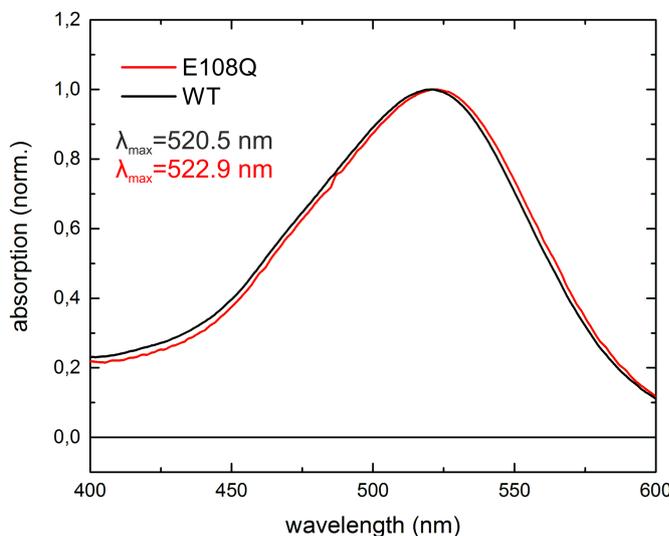


Abbildung 3.3: Normiertes Absorptionsspektrum von GPR-E108Q (rot) und GPR-Wildtyp (schwarz).

rakteristik des Retinals. Dass dieser Einfluss nur sehr schwach ist, liegt vermutlich daran, dass die Carboxygruppe des primären Protonendonors E108 nicht in unmittelbarer Nähe zum Retinal liegt: In Bakteriorhodopsin ist das D96 (das Analogon zum E108 in GPR) etwa  $11 \text{ \AA}$  von der Schiff'schen Base entfernt (nach der Struktur von Luecke et al. [86]).

Die Herstellung der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante wurde von Dr. Jagdeep Kaur vom Arbeitskreis Glaubitz (Goethe-Universität Frankfurt am Main) durchgeführt und erfolgte über ortsspezifische Mutagenese. Die Retinalproteine wurden aufgereinigt, von Imidazol befreit und schließlich in einen Puffer gesetzt, bestehend aus 50 mM Tris-Cl (pH 8,5), 100 mM NaCl und 0,05 % DDM in  $\text{D}_2\text{O}$ . Eine detaillierte Schilderung der Probenpräparation ist in [124] gegeben.

Im Folgenden wird die Photodynamik dieser Mutante erläutert.

### 3.3.1 Die frühe Photodynamik

Die frühe Photodynamik der GPR-E108Q-Mutante bei pD 8,5 ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Die Probe wurde bei 520 nm mit 40 nJ angeregt. Die transiente Absorptionsänderung bis zu einer Verzögerungszeit von 1,9 ns weist im Wesentlichen fünf Signaturen auf, die mit den Buchstaben A bis

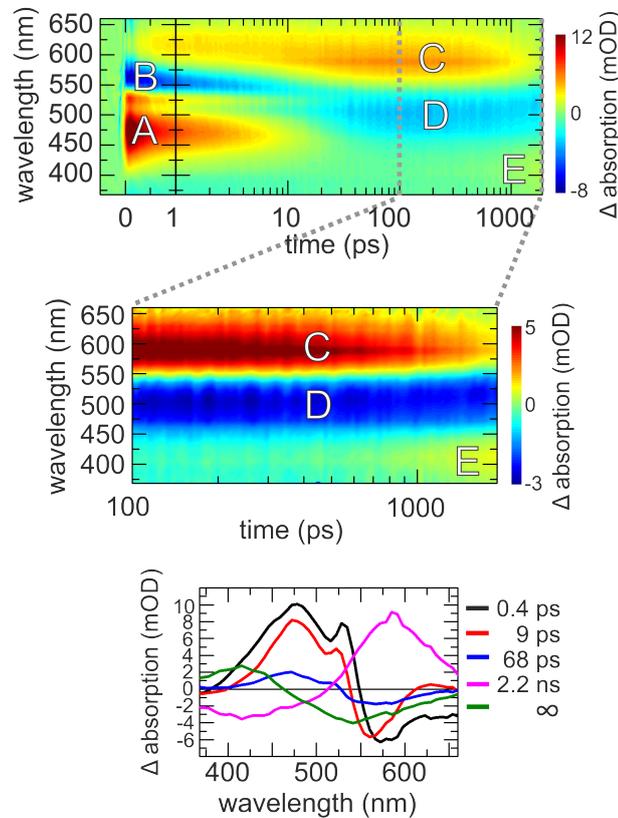


Abbildung 3.4: Ultrakurzzeitphotodynamik der Proteorhodopsinmutante E108Q bei Anregung mit 40 nJ bei 520 nm. Oben: 2D-Darstellung der transienten Absorption von 0 bis 1900 ps. Die Zeitachse ist von 0-1 ps linear und von 1-1900 ps logarithmisch. Mitte: Ausschnitt aus der transienten Absorption von 100-1900 ps. Unten: Zerfallsassoziierte Spektren aus der GLA-Analyse vom gesamten Datensatz.

E gekennzeichnet sind. Bei 450 nm (A) lässt sich eine positive Absorptionsänderung beobachten, die mit einigen Pikosekunden abfällt. Spektral dazu überlappend zeigt sich von etwa 660 nm bis 530 nm eine Bande mit negativer Absorptionsänderung (B). Rotverschoben bei 600 nm (C) bildet sich eine Absorptionsbande, die einige 100 Pikosekunden anwächst und anschließend wieder abfällt. Zeitgleich zu diesem Absorptionszerfall baut sich im blauen Spektralbereich bei 410 nm (E) eine positive Absorptionsverteilung auf. Spektral zwischen den Signaturen C und E befindet sich eine negative Absorptionsbande bei etwa 520 nm (Signatur D), die dem Bleichen des Grundzustands zugeschrieben wird. Diese Prozesse lassen sich auch in Abbildung 3.5 verfolgen, in der drei transiente Absorptionsverläufe bei 403 nm,

497 nm und 580 nm dargestellt sind.

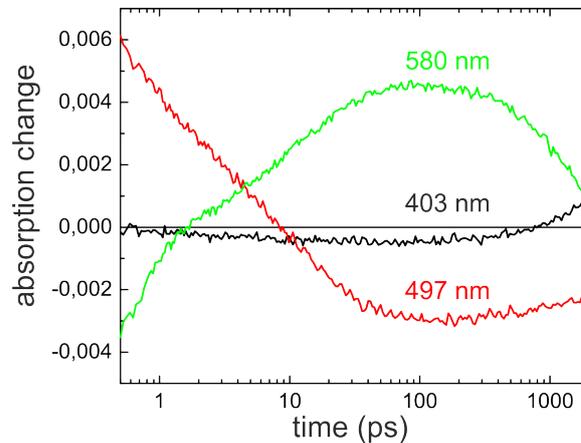


Abbildung 3.5: Transienter Absorptionsverlauf bei 403, 497 und 580 nm der Ultrakurzzeitdynamik (siehe Abbildung 3.4 oben) der Proteorhodopsinmutante E108Q

Die Kinetik dieser Photodynamik lässt sich in der GLA-Analyse am besten mit fünf Zeitkonstanten beschreiben. Die entsprechenden DAS-Spektren sind im unteren Bild von Abbildung 3.4 dargestellt. Die Signaturen A und B erscheinen beide instantan nach der Anregung. Der Zerfall von A und die Rückkehr der Absorption bei B werden beide mit drei Zeitkonstanten beschrieben: 0,4 ps, 9 ps und 68 ps. Alle drei DAS-Spektren haben eine positive (negative) Spektralverteilung bei etwa 480 nm (560 nm). Insofern wird A als Absorption des angeregten Zustandes (Abkz.: ESA, engl.: Excited State Absorption) und B als stimulierte Emission überlagert mit Grundzustandsbleichen interpretiert. Diese Beobachtung findet sich in der frühen Photodynamik vom GPR-Wildtyp (und D97N-Mutante) in sehr ähnlicher Weise wieder [111, 112]. Das durch diesen Prozess entstehende Photoprodukt (Signatur C) wird als K-Intermediat bezeichnet, in dem das Retinal als 13-*cis*-Isomer mit protonierter Schiff'schen Base vorliegt. Die Bildung von K wird beim Wildtyp mit den Zeiten 0,7 ps und 21 ps beschrieben, während es bei der E108Q-Mutante mit 0,4 ps, 9 ps und 68 ps akkumuliert. Eine Besonderheit in der Photodynamik der hier untersuchten Mutante lässt sich ab einigen hundert Pikosekunden Verzögerungszeit beobachten. Die Absorption von Signatur C klingt mit einer Lebensdauer von etwa 2 ns ab, während sich im blauen Spektralbereich bei etwa 410 nm-Signatur E bildet. Diese Bildung einer blau absorbierenden Signatur lässt sich weder

beim Wildtyp noch bei der D97N-Mutante in diesem Zeitbereich beobachten [111, 112].

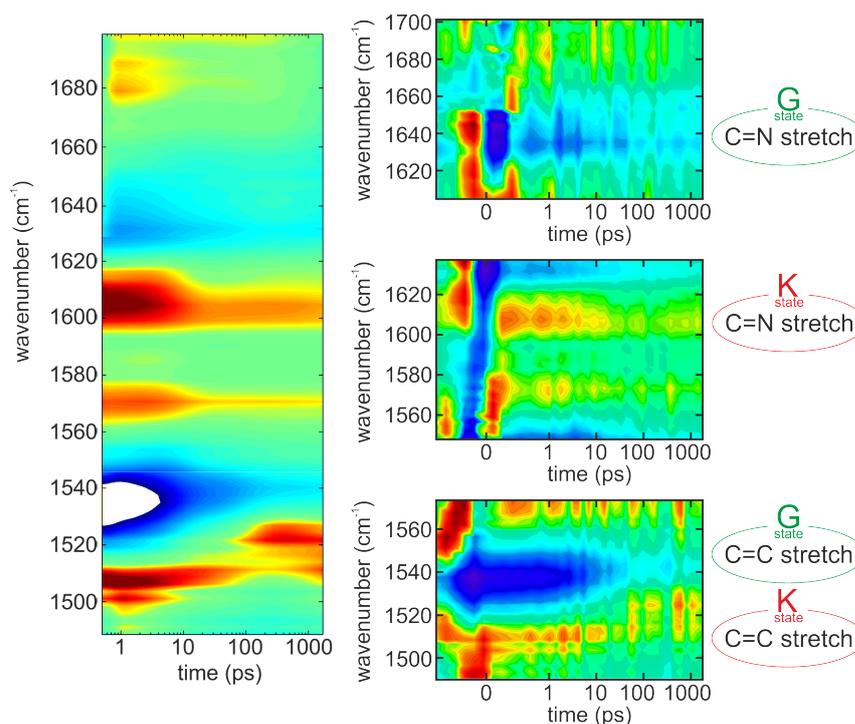


Abbildung 3.6: Ultrakurzzeitphotodynamik der Proteorhodopsin-Mutante-E108Q bei Anregung mit einem 520 nm-Laserimpuls. Rechte Seite: Dargestellt ist der Spektralbereich von 1490-1570  $\text{cm}^{-1}$  (unten), 1540-1640  $\text{cm}^{-1}$  (Mitte) und 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  (oben). Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und dann logarithmisch aufgetragen. Linke Seite: Der Fit der drei Messungen mit einheitlichem Farbcode. Die spektralen Übergänge wurden zueinander skaliert. Der weiße Bereich bei 1530  $\text{cm}^{-1}$  zeigt Werte über dem verwendeten Farbcode an. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von 0,5 ps bis 1770 ps.

Die frühe Photoreaktion von GPR-E108Q wurde außerdem im mittleren Infrarotbereich detektiert. Um die C=C und C=N-Streckschwingungen des Retinals spektral abzudecken, wurde diese Messung in drei verschiedenen, spektral überlappenden Bereichen durchgeführt (siehe Abbildung 3.6). Im Spektralbereich über 1600  $\text{cm}^{-1}$  erscheinen darüber hinaus Amidschwingungen des Proteins. Diese Experimente wurden wie im sichtbaren Bereich in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt, bei einem pD-Wert von 8,5.

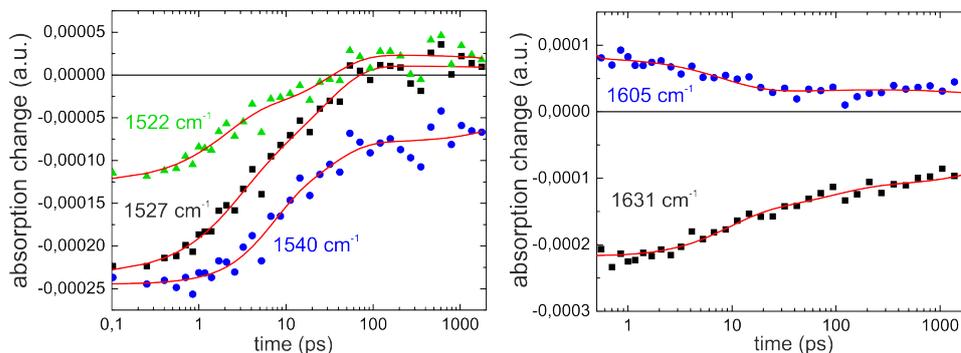


Abbildung 3.7: Transienter Absorptionsverlauf bei  $1522$ ,  $1527$  und  $1540\text{ cm}^{-1}$  (linke Seite) beziehungsweise  $1605$  und  $1631\text{ cm}^{-1}$  (rechte Seite) in der Ultrakurzzeitdynamik (siehe Abbildung 3.6) der Proteorhodopsinmutante E108Q. Die roten Kurven sind die aus der GLA-Analyse gewonnenen Fits.

Bereits vor einer detaillierten Analyse lässt sich feststellen, dass eine sehr hohe Ähnlichkeit sowohl in spektraler als auch in zeitlicher Form zur Photodynamik des Wildtyps unverkennbar ist. Basierend auf dem Vergleich mit dem Wildtyp lassen sich demzufolge vier wichtige Signaturen zuordnen, die die C=C und C=N-Streckschwingungen des Retinals im Grundzustand und im K-Intermediat beschreiben. Deren spektrale Zuweisungen sind in Abbildung 3.6 skizziert.

Die Signale, welche in den Darstellungen von Abbildung 3.6 zu negativen Verzögerungszeiten erscheinen, resultieren aus dem gestörten freien Induktionszerfall (Abkz.: PFID, engl.: Perturbed Free Induction Decay) [125]. Die Signaturen zu positiven Verzögerungszeiten hingegen sind lichtinduzierte Absorptionsänderungen. Das Signal am Zeitnullpunkt wird von mehreren Einflüssen gleichzeitig bestimmt. So wirken hier neben dem Effekt des PFIDs und photoinduzierter Absorptionsänderungen auch Wechselwirkungen zwischen dem Anrege- und Abfragepuls im Lösungsmittel mit. Letzteres wird als Kreuzphasenmodulation bezeichnet.

Analog zu den zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Spektralbereich, sind auch hier Bereiche negativer Absorptionsänderung blau, und positive Bereiche rot dargestellt. Im niederfrequenten Spektralbereich (Abbildung 3.6 unten) erscheinen zwei signifikante Signale bei etwa  $1535\text{ cm}^{-1}$  und  $1510\text{ cm}^{-1}$ . Beiden Signalen gehen zu negativen Verzögerungszeiten

jeweils ein spektral übereinstimmendes PFID-Signal mit gleichem Vorzeichen voran. Die negative Signatur resultiert aus dem Bleichen der C=C-Streckschwingung des Retinals im Grundzustand. Diese Beobachtung deckt sich mit den entsprechenden Messungen vom GPR-Wildtyp [112]. Die positive Absorptionsänderung bei  $1510\text{ cm}^{-1}$  ändert ihr Maximum bei späteren Verzögerungszeiten zu etwa  $1520\text{ cm}^{-1}$ . Dieses Verhalten wird ebenfalls in der Photodynamik des Wildtyps festgestellt und wird als Aufkommen der C=C-Streckschwingung des Retinals von vibronisch angeregten Molekülen im  $S_1$  und  $S_0$ -Zustand interpretiert und zeitlich später der C=C-Streckschwingung im K-Intermediat zugeschrieben. In Abbildung 3.7 sind zusätzlich einzelne zeitaufgelöste Absorptionsverläufe für  $1522\text{ cm}^{-1}$ ,  $1527\text{ cm}^{-1}$ ,  $1540\text{ cm}^{-1}$ ,  $1605\text{ cm}^{-1}$  und  $1631\text{ cm}^{-1}$  aufgetragen.

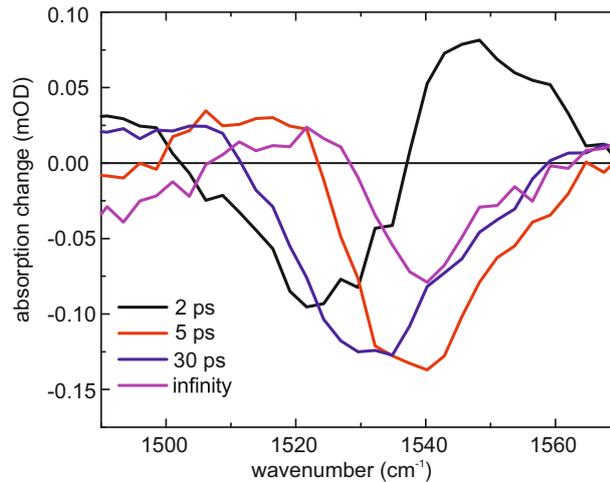


Abbildung 3.8: Zerfallsassozierte Spektren aus der GLA-Analyse der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q im Spektralbereich  $1490\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$ .

Die drei transienten Datensätze (siehe Abbildung 3.6) wurden jeweils einer GLA-Fitanalyse unterzogen. Es zeigte sich, dass die sinnvollste Datenanpassung mit vier Zeitkonstanten umgesetzt wird. Die Ergebnisse dieser Datenanpassung wird im Folgenden vorgestellt. Zunächst wird auf die Kinetik im Spektralbereich zwischen  $1490\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$ , dann  $1545\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$  und schließlich  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.6 von unten nach oben) eingegangen.

### Dynamik zwischen 1490-1570 $\text{cm}^{-1}$

Aus der GLA-Analyse des transienten Datensatzes zwischen 1490-1570  $\text{cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.6 unten) ergeben sich drei Lebensdauern von  $\tau_1=2$  ps,  $\tau_2=5$  ps,  $\tau_3=30$  ps und eine Unendlichkeit  $\tau_\infty$ . Die DAS-Spektren sind in Abbildung 3.8 dargestellt und die sich daraus ergebenden Datenanpassungskurven sind zu einzelnen Wellenzahlen in Abbildung 3.7 in rot abgebildet. Das Spektrum zur Unendlichkeit spiegelt die Differenzabsorption zwischen dem K-Intermediat und dem Grundzustand wider. Es weist ein Minimum bei 1540  $\text{cm}^{-1}$  auf und zwei positive Banden bei etwa 1522  $\text{cm}^{-1}$  und 1511  $\text{cm}^{-1}$ . Die spektrale Form und die drei genannten Extrema finden sich in sehr ähnlicher Weise in der Photodynamik des GPR-Wildtyps [68, 112] wieder. Interessanterweise sind die spektralen Positionen der oben genannten Minima/Maxima allesamt 7-8 Wellenzahlen zu denen des Wildtyps rotverschoben. Wie oben bereits gezeigt (siehe Abbildung 3.3), ist das Absorptionsmaximum des Grundzustands im sichtbaren Bereich ebenfalls bathochrom verschoben. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist folgende: Es ist bekannt, dass die spektrale Position der C=C-Streckschwingung des Retinals invers proportional mit dem Absorptionsmaximum im sichtbaren Spektralbereich zusammenhängt [126, 127]. Eine erhöhte Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen des Retinals impliziert eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums für den elektronischen Übergang. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Stärke der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen abnimmt und sich damit die Resonanzfrequenz der C=C-Streckschwingung erniedrigt.

Die Spektren zu den Zeitkonstanten 5 ps und 30 ps (Abbildung 3.8) weisen jeweils eine intensive negative Bande bei 1540  $\text{cm}^{-1}$  beziehungsweise 1530  $\text{cm}^{-1}$  auf. Diesen beiden Zeitkonstanten wird eine biexponentielle Rückbildung der C=C-Streckschwingung des Grundzustands zugeschrieben. Dieses biexponentielle Verhalten wird beim Wildtyp mit den Zeiten 7 ps und 66 ps beobachtet [112].

Während die Spektren der Zeitkonstanten 5 ps und 30 ps zueinander ähnlich sind, unterscheidet sich das der 2 ps-Lebensdauer signifikant von den anderen. Das Minimum bei etwa 1522  $\text{cm}^{-1}$  beschreibt vermutlich die Bildung eines Photoprodukts (siehe DAS zur Unendlichkeit im Bereich von 1505-1525  $\text{cm}^{-1}$  in Abbildung 3.8). In der Wildtypdynamik wird eine dazu sehr ähnliche Kinetik von 0,6 ps beobachtet. Dieser Prozess wird der Bildung

der C=C-Streckschwingung im K-Intermediat zugeschrieben. Aus diesem Grund wird das in der E108Q-Mutante beobachtete Photoprodukt bei etwa  $1522\text{ cm}^{-1}$  auch als solches interpretiert. Dass die Photoproduktbildung einzig aus der Kinetik der 2 ps-Zeitkonstante resultiert, ist allerdings unwahrscheinlich, da ihr zerfallsassoziertes Spektrum im spektralen Bereich der Photoproduktbande nicht spiegelsymmetrisch zu ihr erscheint. Somit können weitere Prozesse involviert sind, die aufgrund limitierter Zeitauflösung nicht erfasst werden konnten. Außerdem sind nicht-exponentielle Prozesse denkbar, die in der GLA-Analyse nicht berücksichtigt werden.

### Dynamik zwischen $1545\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$

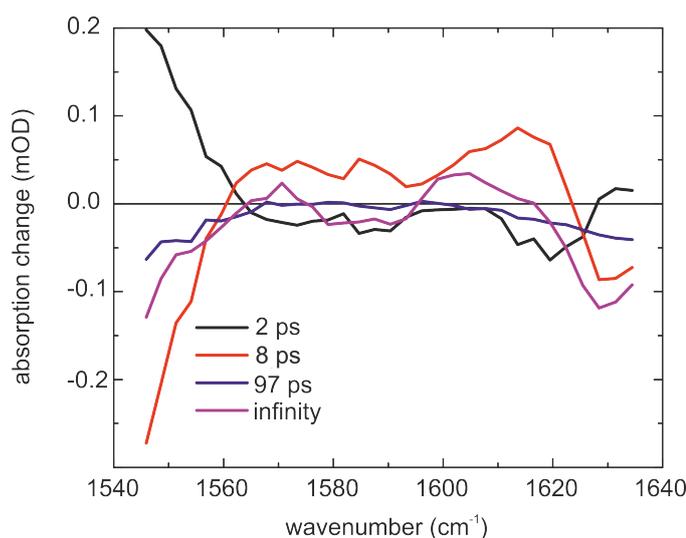


Abbildung 3.9: Zerfallsassozierte Spektren aus der GLA-Analyse der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q im Spektralbereich  $1540\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ .

Der Spektralbereich zwischen  $1545\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.6 Mitte) wurde ebenfalls mit der GLA-Analyse ausgewertet. Die DAS sind in Abbildung 3.9 aufgetragen.

Wieder finden sich vier Zeitkonstanten zur Beschreibung der Dynamik: 2 ps, 8 ps, 97 ps und eine Unendlichkeit. Das zerfallsassozierte Spektrum der unendlichen Zeitkonstante beschreibt die Differenzabsorption zwischen K-Intermediat und Grundzustand. In diesem Unendlichspektrum weisen die Randbereiche des detektierten Spektralbereichs negative Absorption auf.

Die Signatur angrenzend an  $1540\text{ cm}^{-1}$  wurde bereits im vorangegangenen Unterkapitel als Grundzustandsbleichbande der C=C-Streckschwingung identifiziert. Es ist aus anderen Studien bekannt, dass die C=N-Streckschwingung des Retinals im Grundzustand bei  $1628\text{ cm}^{-1}$  absorbiert [68, 128, 129]. Insofern lässt sich die negative Bande bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  als Bleichen dieser Schwingung interpretieren. Die beiden lokalen Maxima bei  $1570$  und  $1605\text{ cm}^{-1}$  sind in sehr ähnlicher Weise auch beim Wildtyp zu beobachten [112] und werden der Absorption des K-Photoprodukts zugeschrieben. Während für die  $1570\text{ cm}^{-1}$ -Signatur noch unklar ist, welche Schwingung dieser zugeschrieben wird, konnte die Absorptionsbande bei  $1605\text{ cm}^{-1}$  als C=N-Schwingung des Retinals im K-Zustand identifiziert werden [112]. Die beiden mittleren Zeiten  $8\text{ ps}$  und  $97\text{ ps}$  weisen in ihren DAS-Spektren negative Absorption im Bereich der spektralen Positionen der C=C und C=N-Bleichbanden des Grundzustands auf ( $1540$  beziehungsweise  $1630\text{ cm}^{-1}$ ). Außerdem zeigt das zerfallsassoziierte Spektrum der  $8\text{ ps}$ -Zeit zwei lokale Maxima auf, die spektral sehr ähnlich zu denen des Unendlichspektrums sind. Dementsprechend beschreibt die  $8\text{ ps}$ -Kinetik vermutlich eine Rückisomerisierung vom *13-cis* zum *all-trans*-Retinal (Grundzustand).

Die schnellste Zeitkonstante ( $2\text{ ps}$ ) beschreibt genau wie in der Messung im Spektralbereich von  $1490$  bis  $1570\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildungen 3.8 und 3.6 Mitte) einen Zerfall in der Absorption bei etwa  $1545\text{ cm}^{-1}$ . Diese Kinetik wird der Bildung der C=C-Streckschwingung im K-Intermediat und dem Zerfall der Absorptionsbande bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet. Letztere beschreibt vermutlich die C=C-Schwingung im angeregten Zustand.

Wie bereits erläutert, beschreibt das Unendlichspektrum in Abbildung 3.9 bei  $1605\text{ cm}^{-1}$  die C=N-Schwingung im K-Zustand. Mit welcher Zeitkonstanten sich diese bildet, kann in dieser Messung nicht festgestellt werden. Dies liegt vermutlich daran, dass die dominante, mit  $8\text{ ps}$  zerfallende Absorptionsbande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.6 Mitte und 3.9) mit der Bildung der verhältnismäßig schwachen  $1605\text{ cm}^{-1}$  C=N-Schwingungsbande überlagert und somit eine kinetische Trennung dieser beiden Prozesse in der GLA-Analyse verhindert.

Das zerfallsassoziierte Spektrum zur  $97\text{ ps}$  Zeit wird wie die  $8\text{ ps}$  Zeit ab etwa  $1565\text{ cm}^{-1}$  negativ. Dies wurde auch in der zuvor vorgestellten Messung (siehe Abbildung 3.8) mit den Zeiten  $5\text{ ps}$  und  $30\text{ ps}$  beobachtet. Insofern wird dieses Verhalten als biexponentielle Rückbildung der C=C Streckschwingung

des Grundzustands interpretiert.

### Dynamik zwischen 1600-1700 $\text{cm}^{-1}$

Der dominante Absorptionsbeitrag im Spektralbereich 1600  $\text{cm}^{-1}$  bis 17000  $\text{cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.6 oben) ist von der Amid I-Bande, welche hauptsächlich (>80%) von der C=O-Schwingung verursacht wird.

Die beiden größten Signale sind zum einen die negative Bande bei etwa 1635  $\text{cm}^{-1}$  (siehe auch transiente Absorption bei 1631  $\text{cm}^{-1}$  in Abbildung 3.7) und zum anderen die positive Absorptionsbande bei 1605  $\text{cm}^{-1}$  (siehe auch entsprechende transiente Absorption in Abbildung 3.7). Beide Signale fallen auf einer Zeitskala von etwa 10 ps partiell ab.

Wie bereits diskutiert, beschreibt die Bande bei 1605  $\text{cm}^{-1}$  die Absorption der C=N-Streckschwingung im K-Intermediat. Es konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die C=N-Streckschwingung des Retinals des Proteorhodopsin-Wildtyps im Grundzustand in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 1635  $\text{cm}^{-1}$  zu beobachten ist [69, 112]. Aus diesem Grund wird die intensive negative Bande bei 1635  $\text{cm}^{-1}$  als Bleichsignal dieser Schwingung interpretiert.

Im Spektralbereich ab etwa 1650  $\text{cm}^{-1}$  konnten keine Absorptionsänderungen detektiert werden, die auf Schwingungsdynamiken des Retinals schließen lassen. Vielmehr spiegeln Signaturen in dieser Region strukturelle Änderungen des Proteins aufgrund von Konformationsänderungen wider. Die kinetische Analyse ist wegen der sehr kleinen Signale nicht eindeutig möglich. Der beste Fit wird wieder mit vier Zeitkonstanten realisiert: 5 ps, 80 ps, 1500 ps und eine Unendlichkeit. Die zerfallsassoziierten Spektren sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

Diese Zahlenwerte können allerdings nur als sehr grobe Anhaltspunkte verwendet werden. Die Werte variieren je nach gewählten Startparametern. Die C=N-Grundzustandsbleichbande im Bereich um 1635  $\text{cm}^{-1}$  scheint mit 5 ps und 80 ps partiell zurückzukehren. Ähnliche Beobachtungen wurden sowohl am GPR-Wildtyp als auch an Bakteriorhodopsin gemacht [66, 68, 69, 102, 112]. Ein Vergleich in der Kinetik ist allerdings aufgrund des verhältnismäßig schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses dieser Messung nicht gerechtfertigt.

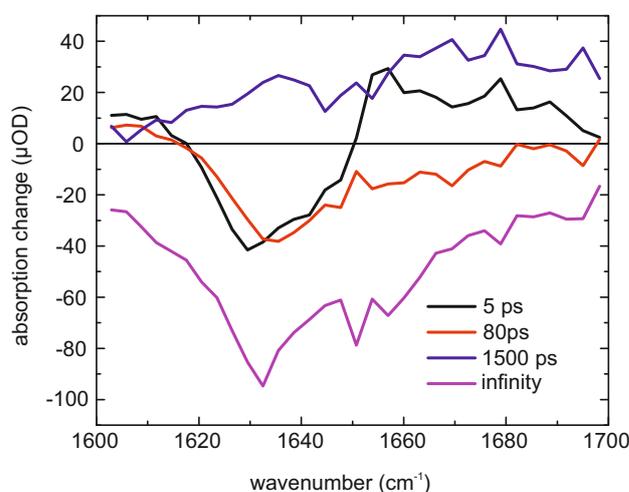


Abbildung 3.10: Zerfallsassozierte Spektren aus der GLA-Analyse der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q im Spektralbereich 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

### Dynamik zwischen 1500-1700 $\text{cm}^{-1}$ bei blauem Anregungslicht

Die oben diskutierte frühe Photodynamik basiert auf der Anregung mit grünem Licht (520 nm). Im Folgenden wird diese bei Anregung mit blauem Licht (390 nm) erläutert und mit der grün induzierten frühen Photoreaktion verglichen.

In Abbildung 3.11 werden die 2D-Darstellungen der transienten Absorptionsmessungen im mittleren Infrarotbereich bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm gezeigt. Man sieht bei einem direkten Vergleich mit Abbildung 3.6, dass sich die Photodynamik nicht von der bei grüner Anregung signifikant unterscheidet. Es lassen sich nahezu alle positiven und negativen Signaturen wiederfinden, die auch in der zuvor diskutierten Messung bei grünem Licht beobachtet werden.

In Abbildung 3.12 sind analog zu Abbildung 3.7 transiente Absorptionsverläufe zu bestimmten Wellenzahlen dargestellt. Ein Vergleich zeigt auch hier, dass sich diese in der Dynamik und Kinetik sehr ähnlich sind.

Der Datensatz um 1530  $\text{cm}^{-1}$  (Abbildung 3.11 unten) wurde mit vier exponentiellen Termen angepasst. Es ergaben sich Zeitkonstanten von 3 ps, 13 ps, 280 ps und eine Unendlichkeit (siehe Abbildung 3.13 oben links).

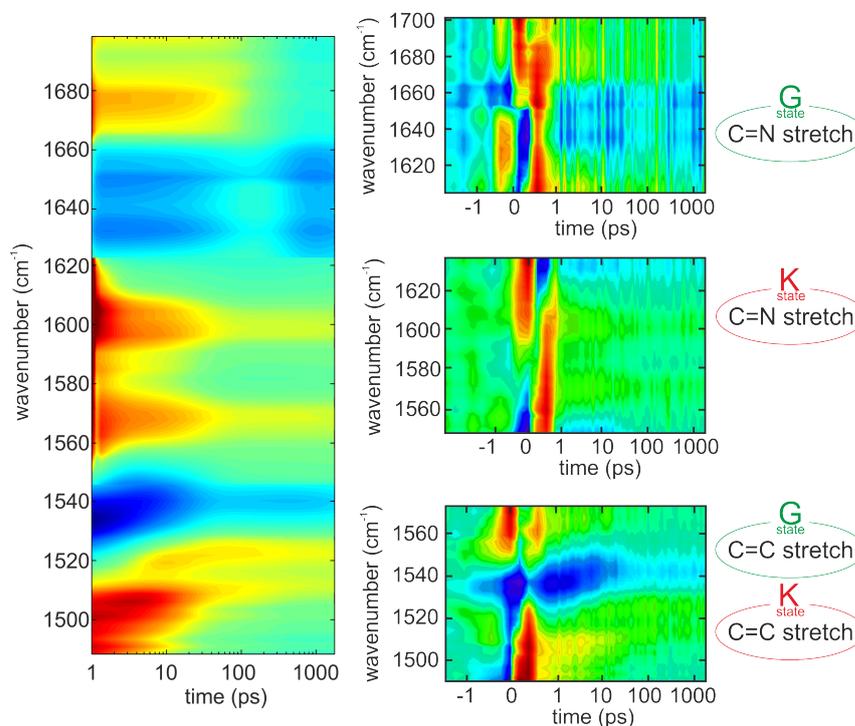


Abbildung 3.11: Ultrakurzzeitphotodynamik der Proteorhodopsinmutante E108Q bei Anregung mit einem 390 nm-Laserimpuls. Rechte Seite: Dargestellt ist der Spektralbereich von 1490-1570  $\text{cm}^{-1}$  (unten), 1540-1640  $\text{cm}^{-1}$  (Mitte) und 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  (oben). Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und dann logarithmisch aufgetragen. Linke Seite: Der Fit der drei Messungen mit einheitlichem Farbcode. Die spektralen Übergänge wurden zueinander skaliert. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von 1 ps bis 1770 ps.

Die DAS-Spektren sowohl der beiden schnellen Lebensdauern als auch der unendlichen Zeit unterscheiden sich in ihrer Form nicht wesentlich von den Entsprechenden bei grüner Anregung. Eine Kinetik im Bereich von 30 ps (grüne Anregung) ist hier allerdings nicht feststellbar. Stattdessen terminiert die Fitroutine mit der langsamen Zeitkonstante von 280 ps, dessen DAS keine Struktur aufweist, sondern spektral gleichmäßig schwach präsent ist. Aus diesem Grund wird angenommen, dass dieser Lebensdauer kein Beitrag in der Photodynamik zuzusprechen ist.

Festzuhalten ist, dass die für den Aufbau des K-Intermediates relevante Zeitkonstante (3 ps) hohe Übereinstimmung hat mit der 2 ps-Kinetik (siehe Abbildung 3.8) und damit ein vergleichbares Ergebnis liefert wie die Experimente bei grüner Anregung.

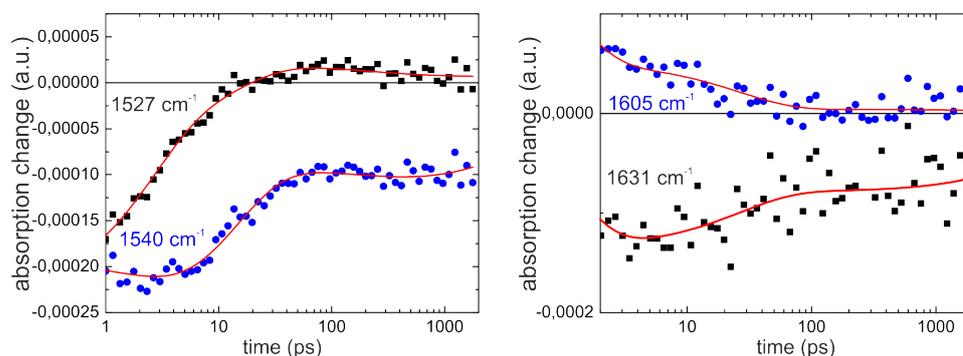


Abbildung 3.12: Transienter Absorptionsverlauf bei  $1527$  und  $1540$   $\text{cm}^{-1}$  (linke Seite) beziehungsweise  $1605$  und  $1631$   $\text{cm}^{-1}$  (rechte Seite) in der Ultrakurzzeitdynamik (siehe Abbildung 3.11) der Proteorhodopsinmutante E108Q bei  $390$  nm-Anregungslicht. Die roten Kurven sind die aus der GLA-Analyse gewonnenen Fits.

Die  $13$  ps Zeit weist in ihrem zerfallsassoziierten Spektrum eine Absorptionzunahme bei etwa  $1540$   $\text{cm}^{-1}$  auf und gleichzeitig einen Zerfall um etwa  $1510$   $\text{cm}^{-1}$ . Dies wurde auch in der dazu analogen Messung bei grüner Anregung mit einer Zeitkonstante von  $30$  ps beobachtet (siehe Abbildung 3.8) und wird als Rückbildung der C=C Schwingung des Grundzustands interpretiert.

Die Messung im Bereich um  $1600$   $\text{cm}^{-1}$  (Abbildung 3.11 Mitte) weist ebenfalls Parallelen zu der bei grünem Anregungslicht auf. So beschreibt das Spektrum zur Unendlichkeit (Abbildung 3.13 oben rechts) wieder zwei lokale Maxima bei etwa  $1600$   $\text{cm}^{-1}$  und  $1570$   $\text{cm}^{-1}$  und negative Bereiche bei  $1540$   $\text{cm}^{-1}$  und  $1630$   $\text{cm}^{-1}$  (siehe auch Vergleich mit Abbildung 3.6 Mitte und oben). Die Kinetik konnte am sinnvollsten mit zwei Zeitkonstanten gefittet werden:  $1$  ps und  $26$  ps. Die langsamere Lebensdauer beschreibt eine Dynamik, die mit der  $8$  ps-Zeit bei grüner Anregung strukturell übereinstimmt. Der schnelle Prozess weist ein anderes zerfallsassoziiertes Spektrum auf. Was allerdings übereinstimmend ist, ist das lokale Maximum bei etwa  $1545$   $\text{cm}^{-1}$ . Die Bleichbanden der C=C und der C=N-Streckschwingung sind folglich auch bei blauer Anregung klar erkennbar.

Im Spektralbereich von  $1600$   $\text{cm}^{-1}$  und  $1700$   $\text{cm}^{-1}$  (Abbildung 3.11 oben) ist eine Datenauswertung kaum möglich da nur sehr schwach ausgeprägte Absorptionsänderungen detektiert werden konnten. Der bestmögliche Fit ergibt sich mit vier Zeitkonstanten (siehe Abbildung 3.13 unten). Angesichts des verhältnismäßig unsicheren Fits aufgrund des schlechten Signal-zu-

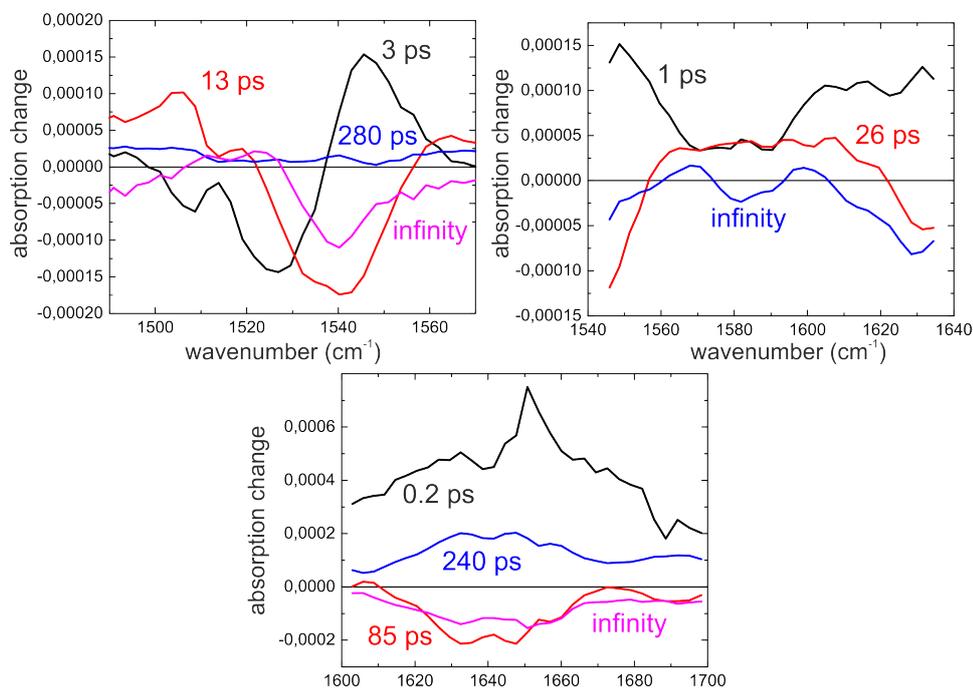


Abbildung 3.13: Zerfallsassoziierte Spektren aus der GLA-Analyse der frühen Photodynamik von Proteorhodopsin-E108Q bei blauem Anregungslicht im Spektralbereich  $1490\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$  (oben links),  $1540\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$  (oben rechts) und  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  (unten).

Rausch-Verhältnisses dienen deren Zahlenwerte allerdings nur einer groben Einschätzung. Eine Gemeinsamkeit in den DAS beider Messungen zeigt sich bezüglich der Unendlichkeit und der Zeitkonstanten von 80 ps beziehungsweise 85 ps: Die lokalen Minima beider Zeitkonstanten bei etwa  $1630\text{ cm}^{-1}$  und  $1650\text{ cm}^{-1}$  bleiben erhalten. Diese negativen Banden entstehen zum einen durch das Bleichen der C=N-Streckschwingung des Retinals im Grundzustand und zum anderen vermutlich durch die Amid I-Bande.

### 3.3.2 Abschätzung zur Quantenausbeute der K-Intermediatsbildung

Um die Quantenausbeute der Bildung des K-Intermediats in der Photodynamik der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante abzuschätzen, empfiehlt es sich, die Absorptionsänderungen der C=C-Streckschwingungen miteinander

zu vergleichen. Denn diese verschieben sich nur minimal (etwa  $3 \text{ cm}^{-1}$ ) bei Änderung des pD-Werts, im Gegensatz zu den sich überlagernden transienten Banden im UV-Vis-Bereich. Eine grobe Abschätzung der Quantenausbeute der K-Zustandsbildung in der E108Q-Mutante relativ zu der im Wildtyp, ist wie folgt möglich: Bildet man den Quotienten aus der Absorptionsänderung bei etwa 100 ps (in diesem Zeitbereich ist das K-Intermediat maximal akkumuliert, wie aus der transienten Absorption bei 580 nm in Abbildung 3.6 ersichtlich wird) und  $1522 \text{ cm}^{-1}$  mit der Absorption bei 0,1 ps und  $1540 \text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.11), erhält man einen Wert, der proportional zur Quantenausbeute ist. Denn der Zähler dieses Quotienten stellt ein Maß für die Akkumulation des K-Intermediates dar und der Nenner gibt näherungsweise an, wieviele Retinalproteine angeregt wurden. Dieser Wert liegt bei der E108Q-Mutante bei etwa 0,1. Zieht man die entsprechenden Werte für den Wildtyp heran (entnommen aus den transienten Verläufen bei 1526 und  $1540 \text{ cm}^{-1}$  von [112] zu den oben genannten Verzögerungszeiten), ergibt sich ein Wert von etwa 0,18. Ein Vergleich dieser Zahlenwerte deutet darauf hin, dass die Bildung vom K-Intermediat um einen Faktor von etwa 1,8 ineffizienter ist als beim Wildtyp.

Dieser Vergleich bezieht sich auf Anregung mit Licht bei 520 nm. Der entsprechende Wert bei Anregung der E108Q-Mutante mit blauem 390 nm-Licht (siehe Abbildung 3.12) liegt schätzungsweise im Bereich 0,05 bis 0,08 und ist somit kleiner als bei grüner Anregung. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Retinal bei hochenergetischer Anregung in einen höheren Zustand als  $S_1$  angeregt wird und dadurch möglicherweise weitere Reaktionspfade möglich werden, die nicht zur Isomerisierung von all-*trans* zu 13-*cis* führen und folglich die Effizienz der Bildung des K-Intermediats reduzieren.

Zu betonen ist, dass die hier gefundenen Werte auf einer groben Abschätzung beruhen und nur relativ zueinander verglichen werden sollten.

### 3.3.3 Der Photozyklus der Mutante E108Q

Um den weiteren zeitlichen Verlauf der GPR-Mutante zu untersuchen, wurden Blitzlichtphotolyseexperimente durchgeführt (Abbildung 3.14). Diese Messung deckt den zeitlichen Bereich von etwa 330 ns bis 1 s ab. Somit bleibt die Zeit von 1-2 ns bis 330 ns undetektiert. Die linke 2D-Darstellung

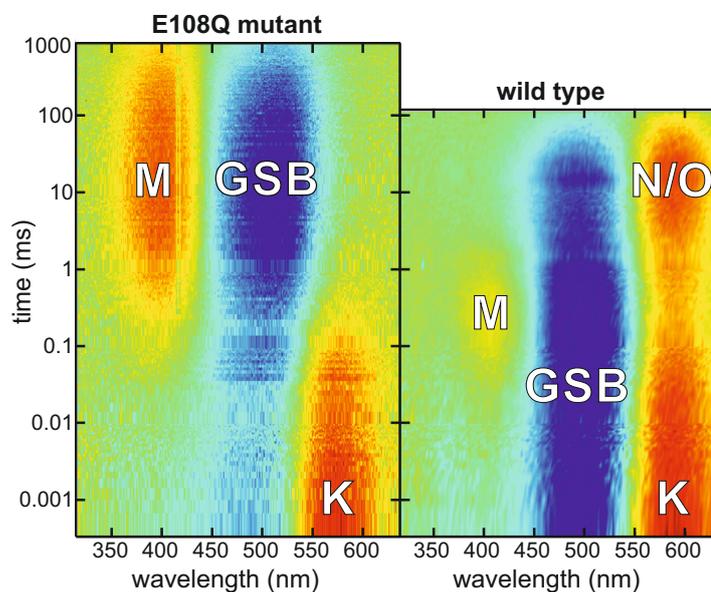


Abbildung 3.14: 2D-Darstellung des Photozyklus von der Proteorhodopsinmutante E108Q (links) beziehungsweise des Proteorhodopsin-Wildtyps (rechts). Rot steht für positive und blau für negative Absorptionsänderung. Grün dargestellte Messpunkte stellen keine beziehungsweise eine verschwindend geringe Absorptionsänderung dar.

in Abbildung 3.14 beschreibt den Photozyklus im genannten Zeitbereich von PR-E108Q. Daneben ist zum Vergleich der des Wildtyps dargestellt. Beide Proben wurden unter gleichen Bedingungen präpariert (50 mM Tris-Cl (pH 8,5), 100 mM NaCl und 0,05 % DDM in H<sub>2</sub>O).

Um die Dynamiken besser miteinander vergleichen zu können, sind in Abbildung 3.15 jeweils drei transiente Absorptionsänderungen aus den 2D-Spektren in Abbildung 3.14 bei 400 nm, 500 nm und 580 nm dargestellt. Die gepunkteten Verläufe sind die Messungen und die durchgezogenen Kurven die aus der GLA-Analyse gewonnenen Fits. Die Photodynamik des Wildtyps lässt sich wie folgt beschreiben:

Bei 400 nm lässt sich eine Absorptionzunahme beobachten, die ihr Maximum bei etwa 200  $\mu$ s findet und nach 10 ms wieder verschwunden ist. Synchron zu dieser Dynamik verhält sich die Transiente bei 580 nm: Die initiale Absorptionsänderung von etwa 0,09 OD (OD: Optische Dichte) fällt

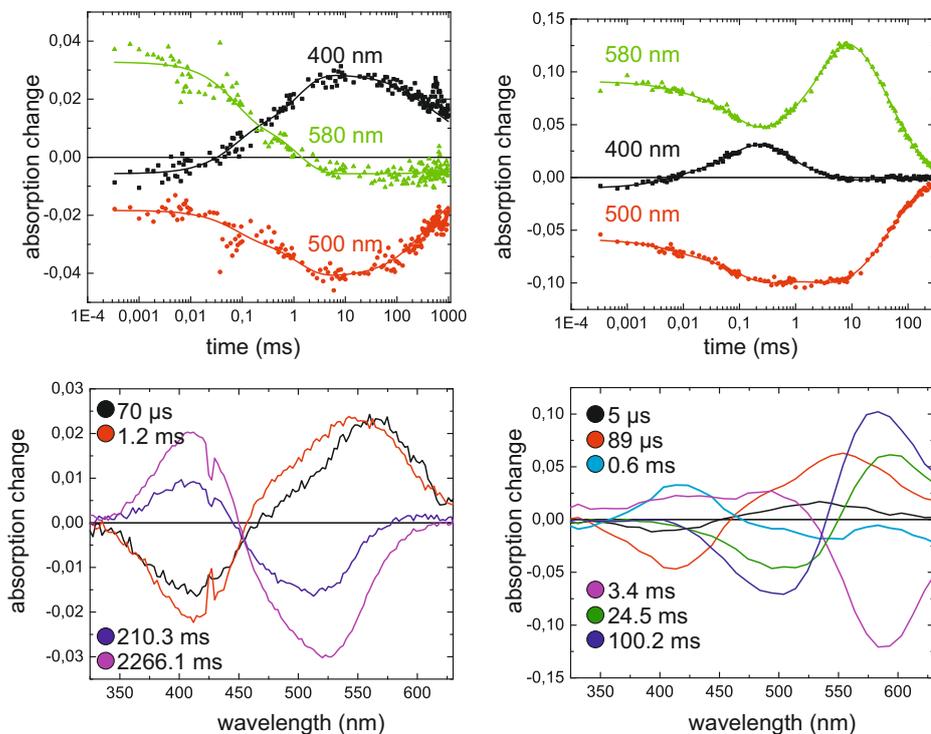


Abbildung 3.15: Photozyklus von E108Q und Wildtyp. Oben: Transiente Absorptionsänderungen bei 400 nm, 500 nm und 580 nm von der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante (links) beziehungsweise von Proteorhodopsin-Wildtyp (rechts). Die durchgezogenen Linien zeigen den Fit und die Punkte stellen jeweils die Messdaten dar. Unten: Die DAS-Spektren zu den Zeiten, die aus der GLA-Analyse resultieren (links: E108Q, rechts: Wildtyp).

bis zum Erreichen des Maximums bei 400 nm auf etwa 0,05 OD ab. Anschließend steigt die Absorption bis etwa 8 ms-Verzögerungszeit an und fällt anschließend wieder bis zur letzten detektierten Verzögerungszeit fast auf 0 OD ab. Die Absorption bei 500 nm verhält sich bis etwa 0,2 ms genau wie die bei 580 nm. Unterschied ist, dass dieser Verlauf im negativen Bereich verläuft. Ab 0,2 ms bleibt die Absorptionsänderung bis etwa 8 ms konstant. Dann kehrt sie synchron mit dem Verlauf bei 580 nm wieder fast auf 0 OD zurück.

Die Interpretation dieser Beobachtungen ist wie folgt [116]: Die Transiente bei 500 nm beschreibt das Bleichen des Grundzustandes, das bei Abschluss des Photozyklus nach einigen 100 ms wieder verschwindet. Die anfangs positive Absorption bei 580 nm ist dem K-Intermediat zuzuordnen. Dieses baut

sich ab und es bildet sich das M-Intermediat, welches im blauen Spektralbereich bei 400 nm detektiert wird. Dessen Akkumulation geht anschließend wieder zurück und geht zu den späten Intermediaten N und O über. Diese finden ihr Absorptionsmaximum beide bei 580 nm. Diese Zustände fallen schließlich ab und folglich kehrt die Absorption des Grundzustandes wieder zurück, welche bei 500 nm beobachtet wird.

Der beste Fit dieses Datensatzes erfolgte mit sechs Zeitkonstanten: 5  $\mu$ s, 89  $\mu$ s, 0,6 ms, 3,4 ms, 25 ms und 100 ms. Die beiden frühen Zeiten weisen in ihren DAS-Spektren eine ähnliche spektrale Form auf. Beide beschreiben eine Absorptionsabnahme bei etwa 550 nm und eine Zunahme bei 410 nm. Dieser biphasige Prozess wird als Übergang vom K zum M-Intermediat interpretiert. Die Zeitkonstanten 0,6 ms und 3,4 ms weisen beide einen Absorptionsrückgang im blauen Bereich auf, weshalb diese den Abbau des M-Zustandes kinetisch charakterisieren. Die längere dieser beiden Lebensdauern beschreibt außerdem eine deutliche Absorptionszunahme bei 580 nm, was als Entstehen der späten Intermediate interpretiert wird. Die DAS-Spektren der beiden größten Zeitkonstanten haben ebenfalls eine sehr ähnliche spektrale Struktur. Beide beschreiben den Zerfall des N und O-Intermediats und gleichzeitig die Rückkehr der Grundzustandsabsorption und damit den Abschluss des Photozyklus.

Der Zerfall des K-Intermediats lässt sich auch bei der Mutante E108Q beobachten: Die anfangs positive Absorption bei 580 nm ist diesmal allerdings bei etwa 5 ms auf nahezu 0 OD ohne eine wiederkehrende Absorptionszunahme zerfallen, die der Akkumulation später Intermediate (N und O) hätte zugeordnet werden können. Dieser Zerfallsprozess spiegelt sich im Absorptionaufbau bei 400 nm wider. Es zeigt sich eine starke Akkumulation des M-Intermediates. Der anschließende Rückgang dieses Zustandes ist nach 1 s noch nicht abgeschlossen. Der gesamte transiente Verlauf bei 400 nm findet sich in umgekehrter Weise bei 500 nm wieder. Auch hier ist die Rückbildung des Grundzustandes nach 1 s noch nicht abgeschlossen.

Der optimierte Fit dieses Datensatzes erfolgte mit vier Zeitkonstanten: 70  $\mu$ s, 1,2 ms, 210 ms und 2250 ms. Die beiden schnellen Lebensdauern weisen beide ein DAS-Spektrum auf, die denjenigen DAS spektral sehr stark ähneln, welche den Abbau von K beziehungsweise den Aufbau des M-Zustandes beschreiben. Folglich zeigt sich bei E108Q ebenfalls ein biexponentieller Aufbau des M-Intermediates. Die zwei großen Zeitkonstanten zeigen deutlich

eine Absorptionsabnahme um 400 nm auf, die in einen Anstieg bei etwa 525 nm übergeht. Demzufolge entsteht und zerfällt das M-Intermediat biphasig. Interessanterweise scheint der Übergang vom M zum Grundzustand ohne eine detektierbare Akkumulation der späten Zustände N und O zu erfolgen. Um sicherzustellen, dass dies auch für spätere Verzögerungszeiten der Fall ist, ist eine zeitaufgelöste Absorptionsmessung mit einer 1 s-Zeitauflösung durchgeführt worden, welche in Abbildung 3.16 dargestellt ist.

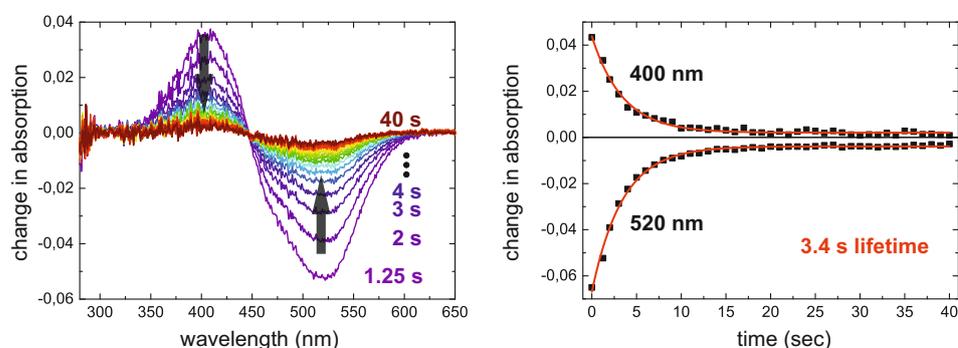


Abbildung 3.16: Absorptionsänderung von PR-E108Q nach Anregung mit grünem Licht (525 nm). Links: Absorptionsänderung in 1 s-Zeitschritten von 1,25 s bis 40 s nach dem Anregungsereignis. Rechts: Transienter Verlauf bei 400 nm und 520 nm. In rot ist der exponentielle Fit dargestellt. Die gefittete Lebensdauer beträgt in beiden Fällen 3,4 s.

Wie die Pfeile im linken Diagramm illustrieren, fällt die Absorptionsbande des M-Intermediates bei etwa 410 nm kontinuierlich ab, während zeitgleich die Absorption des Grundzustandes bei 520 nm zurückkehrt. Im rechten Diagramm ist der zeitliche Verlauf der beiden Extrema als Punktverlauf aufgetragen. Ein monoexponentieller Fit zeigt, dass sowohl der Abbau des M-Intermediates als auch die Rückbildung des Grundzustandes mit einer Zeitkonstanten von 3,4 s erfolgt. Nach 40 s-Verzögerungszeit bleibt zumindest bei 520 nm ein negativer, konstanter OD-Wert übrig, der von null leicht abweicht. Dies liegt vermutlich daran, dass in diesem Experiment ein Bruchteil der angeregten Retinalproteine zerstört sind und somit nicht mehr zum Grundzustand zurückkehren.

### 3.3.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die frühe Photoreaktion der Dynamik des Wildtyps spektral und kinetisch bis zur Bildung des K-Intermediats sehr stark ähnelt. Ein markanter Unterschied zeigt sich etwa ab 100 ps nach dem Anregungsereignis: Die K-Akkumulation bildet sich zumindest partiell mit einer verhältnismäßig langsamen Kinetik zurück (Nanosekundenbereich). Gleichzeitig formiert sich ein spektral sehr breites Produkt im blauen Bereich bei etwa 380-480 nm. Diese Photodynamik lässt sich im Infrarotbereich über die C=C oder C=N-Streckschwingung des Retinals nicht beobachten. Zwischen 1500 und 1700  $\text{cm}^{-1}$  deckt sich die frühe Photoreaktionsdynamik weitestgehend mit der des Wildtyps. Basierend auf den Beobachtungen im sichtbaren Bereich sind Abweichungen frühestens ab etwa 100 ps-Verzögerungszeit zu erwarten. Aufgrund des wesentlich schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von Experimenten im MIR-Bereich (verglichen mit den Messungen im sichtbaren Bereich) ist es nicht unwahrscheinlich, dass Absorptionsänderungen, die den partiellen Zerfall des K-Intermediats beschreiben würden, durchaus stattfinden, allerdings nicht detektiert werden können, da diese im Rauschen untergehen.

Die Blitzlichtphotolysemessung der E108Q-Mutante zeigt wiederum, dass die Photodynamik ab einigen hundert Nanosekunden nach Anregung mit der des Wildtyps im Wesentlichen übereinstimmt. Die blau absorbierende Spezies, die im Nanosekundenbereich entsteht, muss folglich im zwei- bis dreistelligen Nanosekundenbereich wieder abgefallen sein.

Die frühe Photoreaktion im MIR-Bereich bei blauer Anregung weist bis auf die kleinere Quanteneffizienz zur Bildung des K-Intermediats keine merklichen Unterschiede zu den Messungen bei grüner Anregung auf.

Es lässt sich spekulieren, dass der partielle Zerfall des K-Intermediats und die Bildung einer Signatur im blauen Spektralbereich womöglich einen Deprotonierungsprozess der Schiff'schen Base darstellt. Der Akzeptor dieses ultraschnellen Protonentransfers müsste sich in naher Umgebung zur Schiff'schen Base befinden und wahrscheinlich der Rest einer Glutamin- oder Asparaginsäure sein. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um D97 handelt, da dieser erst zu späteren Verzögerungszeiten (siehe Blitzlichtphotolysemessungen) im Zuge der M-Intermediatsbildung protoniert. Stattdessen ist es denkbar, dass D227 das Proton in diesem frühen Prozess aufnimmt.

Um diese Vermutung zu überprüfen, sind Messungen an der Doppelmutante D227N und E108Q geplant. Sollte diese Mutante keinen (zumindest partiellen) Zerfall vom Intermediat K im Subnanosekundenbereich aufweisen, würde dies für diese Vermutung sprechen.

### 3.4 Die lichtinduzierte Deaktivierungsdynamik von Proteorhodopsin

Der oben beschriebene Protonenpumpprozess lässt sich photoinduziert abbrechen. Dieser Effekt ist eine Folge der Photoreaktion des M-Intermediates. Das Retinal liegt in diesem Zustand als 13-*cis*-Isomer mit einer deprotonierten Schiff'schen Base vor. Das M-Intermediat absorbiert im blauen Spektralbereich, weshalb dieser Prozess auch Blaulichteffekt genannt wird und in dieser Arbeit mit BLQ (engl.: BLQ, Blue Light Quenching; deutsch: Blaulichtinhibition) abgekürzt wird.

Gegenstand dieses Kapitels ist die ultraschnelle Photodynamik des BLQ-Effektes von Proteorhodopsin. Diese Studie wurde 2017 veröffentlicht[124]:

Eckert et al., **Ultrafast Photoinduced Deactivation Dynamics of Proteorhodopsin**, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8* (2), 512-517

#### 3.4.1 Der BLQ-Effekt

Vor 40 Jahren wurde der BLQ-Effekt in Bakteriorhodopsin entdeckt [27, 130–133]. Photoelektrische Messungen bei Raumtemperatur zeigten, dass der Protonenpumpprozess von blauem Licht (bei kontinuierlicher grüner Hintergrundbeleuchtung) beeinträchtigt wird [26, 27, 134, 135]. Es stellte sich heraus, dass das blaue Licht von einem Intermediat (M-Zustand) im Photozyklus absorbiert wird, welches sein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat [130–132]. Weiterführende elektrophysiologische Experimente konnten nachweisen, dass die Anregung der 412 nm-Spezies zur Rückbildung des BR Grundzustandes führt [136]. Dieses Ergebnis konnte außerdem mit zeitaufgelösten Resonanz-Raman-Messungen bestätigt werden [137, 138]. Absorptionsänderungsmessungen im sichtbaren Spektralbereich bei Raumtemperatur lieferten eine Zeitkonstante von etwa 200 ns für den BLQ-Prozess (Grundzustandsregeneration) in BR [139, 140].

Über Tieftemperaturmessungen (Abk.: LT, engl: Low Temperature) konnte ein Photoprodukt vom M-Intermediat detektiert werden, welches blauverschoben bei etwa 390 nm absorbiert [141]. Im Widerspruch dazu veröffentlichten Balashov und Litvin LT-Daten, die auf zwei rotverschobene Photoprodukte hinweisen [142]. In beiden Fällen wird das Photoprodukt dem reisomerisierten all-*trans*-Retinal mit deprotonierter Schiff'schen Base zugeschrieben. Eine zeitaufgelöste Messung dieser Photoreisomerisierung fehlt für BR allerdings bis heute.

Im Laufe der Jahre wurde von weiteren, später akkumulierenden Intermediaten im BLQ-Pfad berichtet. Es gibt noch keinen Konsens über die Anzahl der entstehenden Intermediate. So wird von einem bis zu vierstufigen BLQ Prozess berichtet [143]. In anderen Veröffentlichungen wird ein Prozess bestehend aus 3 Schritten diskutiert [144, 145]. Dieses Modell wurde unter anderem auf Basis von FTIR-Experimenten sowohl bei tiefen Temperaturen [146], als auch bei Raumtemperatur [140] herangezogen [147, 148]. Dieser 3-Schritte Prozess wird folgendermaßen interpretiert:

- 1) Reisomerisierung von 13-*cis* zu all-*trans*
- 2) Reprotonierung der Schiff'schen Base
- 3) Rückkehr der Proteinkonformation des Grundzustands

Zeitaufgelöste Doppelpuls-Anrege-Abfrage-Messungen [140, 146] legen nahe, dass es zwei unterschiedliche Photoprodukte  $M'_1$  und  $M'_2$  gibt, die aus der Anregung von den zwei blau absorbierenden Intermediaten  $M_1$  und  $M_2$  des Photozyklus resultieren. Diese beiden Zustände,  $M_1$  und  $M_2$ , beschreiben gemeinsam das M-Intermediat [149, 150]. Entsprechend wurden zwei Zeitkonstanten für den Reprotonierungsschritt festgestellt. Die Reprotonierung vom frühen M-Zustand ( $M_1$ ), erfolgt mit einer Zeitkonstanten von 86 ns während die Schiff'sche Base in  $M'_2$  in 192 ns reprotoniert. Eine Schlussfolgerung dieser Beobachtung ist, dass die Protonenzugänglichkeit der Schiff'schen Base zwischen  $M_1$  und  $M_2$  verschieden sein muss. Es wird deshalb angenommen, dass sich die Schiff'sche Base von der Protonenfreisetzungseite zur gegenüberliegenden Seite der Protonenaufnahme umorientiert. Dieser Prozess wird auch Switch genannt und stellt einen wesentlichen konzeptuellen Schritt im sogenannten IST-Modell dar. IST steht für Isomerisierung, Switch und Transfer eines Ladungsträgers. Nach diesem Modell lässt sich die Funktionsweise eines mikrobiellen Retinalproteins über diese drei Typen

von Prozessen erklären [101, 151].

Der verhältnismäßig schnelle Prozess der Reprotonierung von etwa 100 - 200 ns wirft die Frage auf, wodurch die Schiff'sche Base protoniert wird. Mit LT-FTIR-Messungen konnte nachgewiesen werden, dass D85 dafür verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass dessen C=O-Streckschwingung durch Deprotonierung mit dem gleichen zeitlichen Verhalten verschwindet. Im BR-Photozyklus bildet sich das M-Intermediat im Zuge der Protonierung dieses Aminosäurerestes, weshalb D85 als primärer Protonenakzeptor bezeichnet wird. Dieser gibt nach Anregung des Retinals im M-Zustand sein Proton wieder ab. Insofern lässt sich beim BLQ-Prozess von einem photoinduzierten Switch sprechen, der die Protonentransferichtung wieder umkehrt.

Im Laufe der Jahre wurde der Effekt der lichtinduzierten Deaktivierung auch bei anderen Retinalproteinen beobachtet, die nicht nur wie bei Bakteriorhodopsin als Ionenpumpen agieren (Proteorhodopsin [60], Halorhodopsin [152]), sondern auch sensorische Funktion (Sensorrhodopsin II [153]) oder einen lichtgetriebenen Ionenkanal haben (Channelrhodopsin-2 [154]).

Erstaunlicherweise wurde dieser Effekt bisher einzig in Bakteriorhodopsin auf molekularer Ebene untersucht. Dabei hätte ein tieferes Verständnis dieses Effektes Potential für die Entwicklung von optogenetischen oder photosensitiven Anwendungen. Die Präzision in der Kontrolle des Ladungstransfers über einen Ionenkanal wie Channelrhodopsin-2 kann möglicherweise signifikant verbessert werden. Dies könnte erreicht werden, wenn es gelingt die Schließung und Öffnung des Ionenkanals über den kontrollierten Einsatz von grünem (Kanalöffnung) und blauem (Kanalschließung) Licht zu steuern. Damit dieses Ziel erreicht werden kann, ist die Kenntnis und das Verständnis der BLQ-Photodynamik eine grundlegende Voraussetzung. Dies impliziert auch dessen Primärreaktion auf ultraschneller Zeitskala, welche bisher noch an keinem Retinalprotein gemessen wurde.

In diesem Kapitel wird die erste zeitaufgelöste Messung der BLQ-Photodynamik eines Retinalproteins präsentiert, die mit einer Zeitauflösung von etwa 250 fs auch den ersten Schritt der Photoreisomerisierung detektiert. Gegenstand dieser Untersuchung ist grün absorbierendes Proteorhodopsin. Im Folgenden wird zunächst erläutert, wie die BLQ-Ultrakurzzeitphotodynamik von GPR gemessen werden kann. Danach wird die GPR-BLQ-Photodynamik im sichtbaren und mittleren Infrarotbereich beschrieben und verglei-

chend mit Bakteriorhodopsin diskutiert. Abschließend erfolgt im Fazit eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studie.

### 3.4.2 Die E108Q-Mutante im photostationären Zustand

Eine zentrale Herausforderung in der Detektion der ultraschnellen BLQ-Photodynamik ist die Präparation von GPR im M-Intermediat. Dessen Population muss hinreichend groß sein, um detektierbare Absorptionsänderungen induzieren zu können. Prinzipiell sind zwei Vorgehensweisen bei Raumtemperatur denkbar.

Eine Möglichkeit besteht darin, die M-Photodynamik über eine sequentielle 2-Photonenanregung zu messen. Das erste, grüne Photon initiiert den Photozyklus und das zweite, blaue Photon induziert den BLQ-Photoprozess. Der Zeitversatz zwischen diesen Lichtpulsen muss experimentell so gewählt werden, dass das blaue Anregungslicht genau dann auf das GPR-Ensemble trifft, wenn das M-Intermediat im Laufe des Photozyklus maximal akkumuliert ist.

Eine alternative, technisch deutlich weniger aufwändige Methode ist die Folgende: Wenn ein Ensemble von GPR-Proteinen kontinuierlich mit grünem Licht beleuchtet wird, geht es in ein photostationäres Gleichgewicht (PSG) über. In diesem Zustand liegt im Proteinensemble von jedem Intermediat des Photozyklus eine Fraktion an Retinalproteinen vor. Das M-Intermediat hat als einziger Zustand des Photozyklus sein Absorptionsmaximum im blauen Spektralbereich. Dies bringt den Vorteil mit sich, dass eine blaue Anregung von GPR im PSG sehr selektiv nur die Fraktion der Proteine im M-Zustand anregt, wodurch Mischkinetiken vermieden werden.

Wie stark die jeweiligen Intermediate im PSG akkumulieren, hängt von der Kinetik des jeweiligen Zustandes ab. Im Wildtyp akkumuliert das M-Intermediat im Photozyklus sehr schwach. Dieser Umstand macht die Detektion der M-Photodynamik sowohl über sequentielle 2-Photonenanregung als auch über die PSG-Methode sehr problematisch.

In Abbildung 3.17 ist im linken Diagramm in schwarz die Absorptionsdifferenz vom GPR-Wildtyp zwischen dem PSG-Zustand und dem Grundzustand dargestellt. Es zeigt sich eine negative Absorptionsänderung um 500 nm und eine Absorptionszunahme bei etwa 570 nm. Letzteres resultiert aus der Ak-

kumulation der späten Intermediate N und O im photostationären Gleichgewicht. Die negative Bande ist als Bleichsignal des Grundzustands zu interpretieren. Im blauen Spektralbereich zeigt sich keine Absorptionsänderung und damit keine Akkumulation des M-Zustandes. In grau ist die Differenz zwischen der Absorption nach und vor der kontinuierlichen Belichtung dargestellt. Die Nulllinie deutet darauf hin, dass ein Schaden durch die Dauerbeleuchtung der Proteine nicht detektierbar ist.

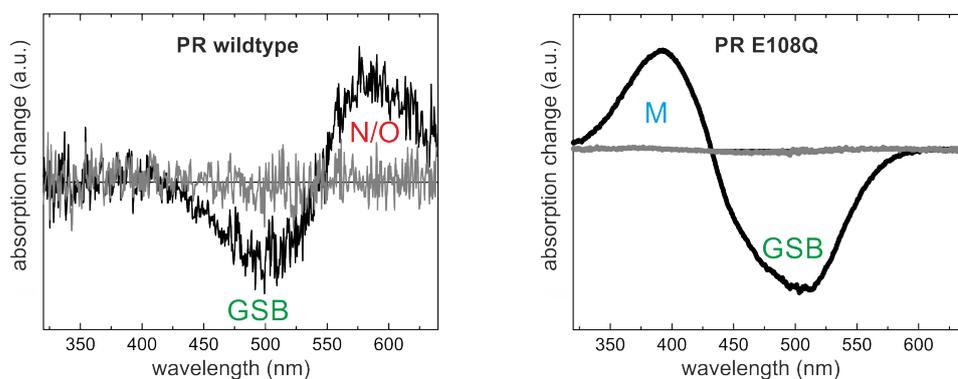


Abbildung 3.17: GPR-Wildtyp (links) und GPR-E108Q (rechts) im photostationären Gleichgewicht. Der schwarze Verlauf stellt jeweils das Differenzspektrum zwischen der Absorption im photostationären Zustand und des Grundzustands dar. Der photostationäre Zustand wurde über kontinuierliche Beleuchtung mit grünem Licht generiert. Der graue Verlauf zeigt jeweils die Differenz der Absorption nach und vor der Dauerbelichtung.

Im rechten Diagramm von Abbildung 3.17 ist die Absorptionsdifferenz zwischen dem PSG- und dem Grundzustand der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante aufgetragen (schwarze Kurve). Wieder lässt sich das Bleichen des Grundzustandes um 500 nm beobachten. Gleichzeitig baut sich eine breite Absorptionsbande um etwa 390 nm auf (M-Intermediat), die sich beim Wildtyp nicht beobachten lässt. Auffällig ist außerdem, dass bei der E108Q-Mutante keine Anreicherung der späten Intermediate festgestellt werden kann. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der hier dargestellten Messergebnisse ist wesentlich besser als die des Wildtyps. Grund ist die langsame Kinetik der Mutante, die zu größeren Absorptionsänderungen im photostationären Gleichgewicht führen.

Diese Messung macht deutlich, dass sich die E108Q-Mutante für die Un-

tersuchung der Photodynamik des M-Zustands eignet. Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente zur BLQ-Dynamik an dieser Mutante im PSG-Zustand durchgeführt.

### 3.4.3 Die BLQ-Photodynamik im UV-Vis-Bereich

Wie oben bereits erläutert, erfolgt die photoinduzierte Rückbildung des Grundzustandes und damit die Unterbrechung des Protonenpumpprozesses über die Anregung des Retinals im M-Intermediat.

Um die photoinduzierte Dynamik des Retinals im M-Intermediat zu beobachten, wurden ultraschnelle Absorptionsänderungen im sichtbaren und mittelinfraroten Bereich gemessen. Um eine möglichst hohe Population von Retinalproteinen im M-Zustand im Detektionsvolumen der Probe zu erzielen, wurde die Kuvette mit einem Strahldurchmesser von etwa 10 mm seitlich über eine Quarzglasfaser kontinuierlich mit grünem Licht beleuchtet. Hierzu wurde der VERDI-5W-Laser von Coherent verwendet, der die Probe mit 350 mW bei einer Wellenlänge von 532 nm belichtete. Zur Anregung des Retinals im M-Zustand wurde die Zweite Harmonische der Laserfundamentalen eines Ti:Sa-Lasers bei 775 nm in einem BBO-Kristall generiert. Dieser Prozess lieferte Anregepulse bei einer zentralen Wellenlänge von 390 nm.

In Abbildung 3.18 a) ist die ultraschnelle Absorptionsänderung im sichtbaren Bereich dargestellt. Bei etwa 400 nm zeigt sich eine negative Absorptionsänderungsbande, die aus dem Bleichen des M-Intermediats nach Anregung mit blauem Licht resultiert. Im roten Bereich von 450 nm bis 650 nm befindet sich eine spektral sehr breite Signatur, die auf einer Piko-sekundenskala wieder zerfällt. Nach 10 ps sind zwei Spezies mit positiver Absorptionsänderung bei 600 nm und 460 nm zu beobachten, wobei Letztere wesentlich intensiver in Erscheinung tritt. In Abbildung 3.18 b) ist der zeitliche Bereich von 500 ps bis 1900 ps der Messung dargestellt. Hier zeigt sich deutlich, dass die Bande bei 460 nm im Nanosekundenbereich abfällt, während ein Photoprodukt bei 525 nm erscheint.

Das Absorptionsspektrum zu der spätesten, detektierten Verzögerungszeit von 1900 ns ist zusätzlich in Abbildung 3.18 c) als schwarze, durchgezogene Kurve aufgetragen. In gestrichelter Form ist außerdem das Absorptionsspektrum des Grundzustands von PR-E108Q gegeben. Für eine bessere Ver-

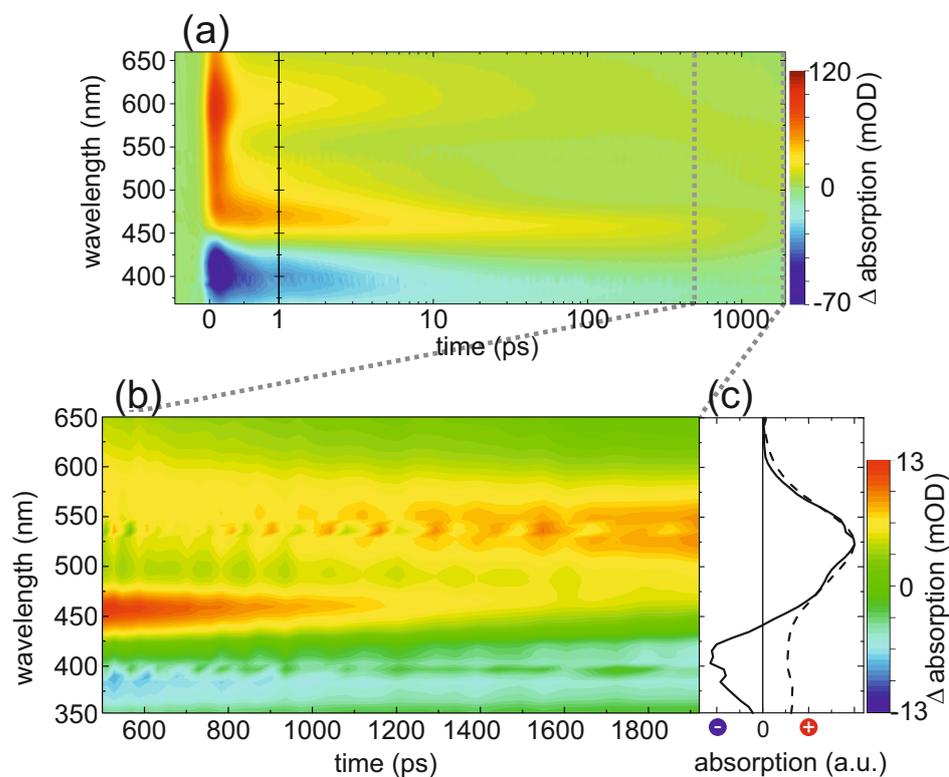


Abbildung 3.18: Ultrakurzzeitdynamik der photoinduzierten Deaktivierung der Proteorhodopsinmutante E108Q bei Anregung mit 40 nJ bei 390 nm. a) 2D-Darstellung der transienten Absorption von 0 bis 1900 ps. Die Zeitachse ist von 0-1 ps linear und von 1-1900 ps logarithmisch. b) Ausschnitt aus der transienten Absorption von 500-1900 ps. c) Durchgezogene Kurve: Normierte Absorptionsänderung bezüglich der Verzögerungszeit 1900 ps. Gestrichelte Kurve: Normierte Absorption des Grundzustands.

gleichbarkeit sind diese zueinander normiert dargestellt. Auffällig ist eine hohe spektrale Ähnlichkeit des Photointermediats mit dem Grundzustand. Dass die beiden Messungen im blauen Spektralbereich nicht übereinstimmen, liegt an dem Bleichen des M-Intermediats, welches bei einer Messung des Grundzustands nicht auftaucht.

Die zerfallsassoziierten Spektren der GLA-Analyse zu dieser Messung sind in Abbildung 3.19 b) dargestellt. Der sinnvollste Fit ergibt sich mit sechs Zeitkonstanten: 0,2 ps, 2 ps, 13 ps, 200 ps, 1 ns und eine Unendlichkeit. Das zerfallsassoziierte Spektrum zur Unendlichkeit ist nicht gezeigt, da dieses le-

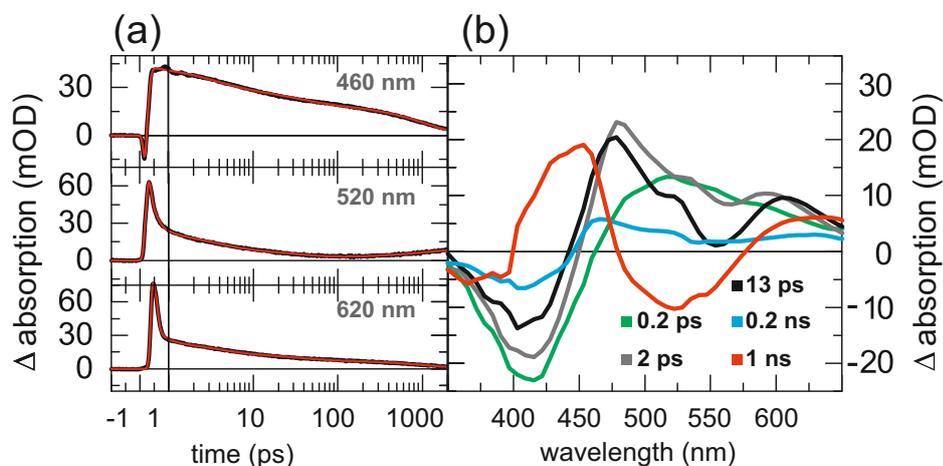


Abbildung 3.19: a) Transiente Absorptionsänderungen bei 460, 520 und 620 nm (schwarz) mit den Fits (rot) aus der GLA-Analyse. b) Zerfallsassoziierte Spektren aus der GLA-Analyse.

diglich der Absorptionsänderung zur spätesten Verzögerungszeit entspricht (siehe Abbildung 3.18 c), schwarze Linie) und keine Information über die Photodynamik liefert. In Abbildung 3.19 a) sind die transienten Absorptionsverläufe bei 460, 520 und 620 nm (schwarze Kurven) mit den entsprechenden Fits (rote Kurven) aufgetragen.

Die spektralen Eigenschaften der DAS-Spektren bezüglich der ersten vier Zeitkonstanten weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Sie beschreiben allesamt einen breiten Absorptionszerfall im Bereich von etwa 450 nm bis 650 nm. In diesem Bereich zeigen sich zumindest für die 2 ps und 13 ps-Zeit drei lokale Maxima bei etwa 475 nm, 525 nm und 600 nm. Außerdem zeigt sich zu allen Lebensdauern (außer der 1 ns-Kinetik) eine Absorptionzunahme im blauen Spektralbereich bei etwa 410 nm.

Das DAS-Spektrum zur 1 ns-Zeitkonstante weist eine gänzlich andere spektrale Struktur auf. Diese beschreibt die spätere Photodynamik: der Zerfall in der Absorption bei etwa 450 nm und gleichzeitig der Aufbau eines Photoproduktes um 525 nm.

Die negative Signatur bei 400 nm wird dem Zerfall des Bleichens der Absorption des Retinals im M-Intermediat zugeschrieben. Die breite Absorptionsbande, welche sich unmittelbar nach der Photoanregung aufbaut, wird als ESA-Signal interpretiert. Dessen Zerfall wird im Wesentlichen durch drei Zeitkonstanten beschrieben (0,2 ps, 2 ps, 13 ps) und teilweise auch

von der 0,2 ns-Zeit bestimmt. Die DAS-Spektren dieser Zeitkonstanten weisen eine Absorptionzunahme im blauen Spektralbereich auf, was auf eine ultraschnelle Rückkonvertierung zum Zustand M hinweisen könnte. Die spektralen Positionen der Minima in den DAS-Spektren sind allerdings rotverschoben zum Absorptionsmaximum des M-Intermediats. Die negative Signatur des 0,2 ps-DAS beispielsweise, reicht bis zu etwa 460 nm. Diese Beobachtung wird dahingehend interpretiert, dass diese Zeitkonstanten außerdem das Entstehen eines rotverschobenen Photoproduktes beschreiben, welches sein Maximum bei etwa 460 nm in den zeitaufgelösten Messungen findet (siehe Abbildung 3.18 a)). Diese Spezies soll hier und im Folgenden als M'-Intermediat bezeichnet werden.

Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass die hier beschriebene frühe Photokinetik des M-Zustandes stark der primären Photoreaktion vom Grundzustand ähnelt: In beiden Prozessen wird der Zerfall der ESA-Banden und der Aufbau eines Photoproduktes (M'-Zustand bei der M-Photodynamik und K-Zustand bei der Grundzustands-Photodynamik) durch drei auffällig ähnliche Zeitkonstanten beschrieben [106, 108].

Wie bereits erwähnt, zeigt die spektrale Form des später entstehenden Photoproduktes bei 525 nm (siehe Abbildung 3.18 b) und c)) eine hohe Übereinstimmung mit der Absorptionscharakteristik des Grundzustandes auf. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Rückkehr des Retinalproteins in den Grundzustand über die Anregung des M-Intermediats auf einer Nanosekundenzeitskala stattfindet. Demzufolge ist der Prozess der Regenerierung des Grundzustandes über den BLQ-Effekt um etwa acht Größenordnungen schneller, verglichen mit der Rückkehr der Grundzustandsabsorption im Photozyklus (etwa 100 ms, siehe auch Abbildung 3.15 unten rechts).

Dieser Interpretation folgend, ist das Photoprodukt bei 460 nm (M'-Zustand) ein Intermediat in der Photodynamik des ultraschnellen BLQ-Prozesses. Dieser Prozess startet mit der Anregung des Retinals im M-Intermediat. In diesem Zustand liegt das Chromophor als 13-*cis*-Isomer mit deprotonierter Schiff'schen Base vor. Endpunkt des BLQ-Prozesses ist das Retinalprotein im Grundzustand, in dem das Retinal die all-*trans*-Konfiguration mit protonierter Schiff Base annimmt. Die zu untersuchende Dynamik besteht aus mindestens zwei Schritten: Die Reisoomerisierung von der 13-*cis* zur all-*trans*-Konfiguration und die Reprotonierung der Schiff'schen Base. Protonentransferprozesse sind in der Regel deutlich langsamer als Übergänge

in der Isomerisierung. Es kann folglich angenommen werden, dass zunächst die Reisoomerisierung direkt nach der Photoanregung stattfindet.

Die Vermutung liegt nahe, dass das M'-Intermediat sehr wahrscheinlich die Absorption des Retinals in der all-*trans*-Konfiguration bei deprotonierter Schiff'schen Base beschreibt. Eine Potentialtopfnäherung bezüglich der Absorptionseigenschaften des Retinals untermauert diese Annahme:

Die aufzubringende Energie für den elektronischen Übergang von  $S_0$  zu  $S_1$  lässt sich in der Potentialtopfnäherung berechnen über

$$\Delta E = \frac{h^2}{8m_e L^2} ((n+1)^2 - n^2) \quad (3.1)$$

, wobei  $n$  das niedrigste, besetzte Energieniveau ist und  $L$  für die Potentialtopflänge steht. Das  $\pi$ -Elektronensystem des Retinals besteht aus zwölf Elektronen. Da jedes Energieniveau über entgegengesetzt gerichtete Spins zweifach besetzt ist, ergibt sich für das Retinal im Grundzustand  $n = 6$ . Wird der Quotient zweier Energien von zwei elektronischen Übergängen dieses Systems gebildet, ergibt sich

$$\frac{\Delta E_1}{\Delta E_2} = \left( \frac{L_2}{L_1} \right)^2. \quad (3.2)$$

Bei photonischer Anregung folgt daraus

$$\frac{\lambda_2}{\lambda_1} = \left( \frac{L_2}{L_1} \right)^2. \quad (3.3)$$

$\lambda_i$  steht für die Wellenlänge des Photons für den entsprechenden Übergang. Die Länge des  $\pi$ -Elektronensystems des Retinals lässt sich über die Länge der Polyenkette grob abschätzen. Diese besteht bei der all-*trans*-Konfiguration aus elf C-zu-C-Verbindungen. Im Falle des 13-*cis*-Retinals breitet sich das  $\pi$ -System über mindestens 9 C-zu-C-Verbindungen aus. Ab Kohlenstoff-13 ist das  $\pi$ -System unterbrochen beziehungsweise erfährt einen Knick, dessen Winkel hier für eine sehr grobe Annäherung mit  $45^\circ$  abgeschätzt wird. Die Länge des abgelenkten Rests bis zur Schiff'schen Base lässt sich mit der Länge von 2 C-zu-C-Verbindungen einer Polyenkette ansatzweise festlegen. Lässt man diesen Rest zunächst außer Acht und setzt für das  $\pi$ -System des 13-*cis*-Retinals eine Länge von 9 an, ergibt sich mit Gleichung 3.3 eine zentrale Wellenlänge von etwa 597 nm für das all-*trans*-Retinal (bei deprotonier-

ter Schiff'schen Base), wenn angenommen wird, dass das 13-*cis*-Retinal im M-Intermediat bei 400 nm absorbiert. Eine sinnvollere Abschätzung ist allerdings der Einbezug des abgeknickten Restes des 13-*cis*- $\pi$ -Elektronensystems. Verlängert man die zuvor herangezogene Länge von 9, indem man die Projektion des abgeknickten Teiles (Länge von 2) entlang der Achse der Polenkette bis zu Kohlenstoff-13 aufaddiert, ergibt sich eine Gesamtlänge von  $9 + 2 * \sin(45)$  und daraus eine Wellenlänge von 446 nm. Das M'-Intermediat absorbiert bei 460 nm und folgt demnach der errechneten Tendenz. Zu betonen ist allerdings, dass die hier erläuterte Rechnung auf einer sehr groben Vereinfachung beruht. Für eine tiefere Analyse sind quantenchemische Rechnungen erforderlich.

#### 3.4.4 Die BLQ-Photodynamik im MIR-Bereich

Neben der Detektion der ultraschnellen BLQ-Dynamik im sichtbaren Bereich, wurde auch die Absorptionsänderung im mittleren Infrarotbereich untersucht. Es wurde die Photodynamik bis zu einer Verzögerungszeit von 1900 ps gemessen. Um in diesem Spektralbereich untersuchen zu können, ob die Photodynamik des Retinals nach Anregung im M-Zustand tatsächlich bereits in der gemessenen Zeitspanne bis 1900 ps in den Grundzustand zurückzukehren beginnt, ist die Absorptionscharakteristik des Grundzustandes und des M-Intermediates im MIR-Bereich hilfreich. Dazu wurde eine Fourier-Transform Infrared (FTIR) Absorptionsmessung durchgeführt. Die IR-Absorption wurde vor und während der Beleuchtung mit grünem Licht gemessen. Aus der Differenz dieser beiden Spektren ergibt sich schließlich das Differenzspektrum zwischen dem Grundzustand und dem M-Intermediat. Diese ist in Abbildung 3.20 als gestrichelte Kurve dargestellt.

Im Bereich von  $1500 \text{ cm}^{-1}$  und  $1700 \text{ cm}^{-1}$  befinden sich die C=C und C=N-Streckschwingungen des Retinals. Dieser Spektralbereich wurde in den zeitaufgelösten Experimenten in drei spektral überlappenden Messungen unterteilt. Die Spektren zur spätesten experimentell erfassten Verzögerungszeit (1900 ps) sind in Abbildung 3.20 als durchgezogene Kurven dargestellt. Für eine bessere qualitative Vergleichbarkeit wurden die drei Spektren der transienten Absorptionsmessungen unabhängig voneinander skaliert.

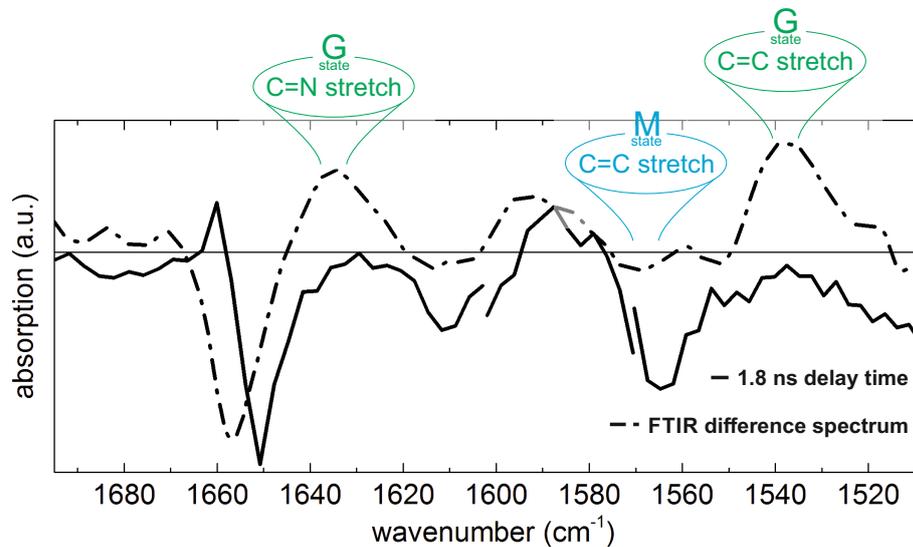


Abbildung 3.20: Durchgezogene Kurven: Absorptionsänderung im MIR-Bereich der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante bezüglich der Verzögerungszeit 1.8 ns in der BLQ-Dynamik. Diese Daten stammen aus drei verschiedenen Messungen. Die drei Kurven sind aufskaliert, um sie besser mit dem gestrichelten Verlauf vergleichen zu können. Gestrichelte Kurve: FTIR-Differenzspektrum zwischen der MIR-Absorption des Grundzustandes und des M-Intermediats.

Negative Signatures beschreiben sowohl im FTIR-Differenzspektrum als auch in den Absorptionsänderungen der transienten Messungen die Absorptionscharakteristik des M-Zustandes. Positive Amplituden sowohl in der FTIR-Messung als auch in den zeitaufgelösten Daten werden folglich der Absorption des Grundzustandes zugeordnet. Der Vergleich dieser Messungen weist sowohl in den spektralen Positionen der Minima als auch der Maxima eine hohe Ähnlichkeit auf. Diese Beobachtung deutet bereits darauf hin, dass nicht nur im sichtbaren Bereich, sondern auch im mittleren Infrarotbereich die Absorptionscharakteristik des Grundzustandes bereits im Nanosekundenbereich nach Initiierung des BLQ-Prozesses zurückkehrt. Einzig im Bereich um  $1650\text{ cm}^{-1}$  zeigt sich ein größerer spektraler Versatz. Absorptionsänderungen in diesem Bereich sind hier - im Gegensatz zu dem niederenergetischeren Bereich - maßgeblich vom Absorptionsverhalten des Proteins und nur schwach vom Retinal selbst beeinflusst. Auf diese Beobachtung wird später noch genauer eingegangen.

Im FTIR Spektrum fällt auf, dass die Minima relativ zu den Maxima kleiner

erscheinen. Grund ist Folgender: Während der FTIR-Absorptionsmessung ohne Beleuchtung mit grünem Licht, kann davon ausgegangen werden, dass sich nahezu 100% der Proteine im Grundzustand befinden. Im photostationären Gleichgewicht hingegen ist eine vollständige Konvertierung dieser Proteine in den M-Zustand nicht möglich. Deshalb ist die Absorptionsänderung bezüglich des M-Intermediats zwangsweise geringer als die des Grundzustandes.

Für eine kinetische Analyse sind im nächsten Schritt die transienten Verläufe heranzuziehen.

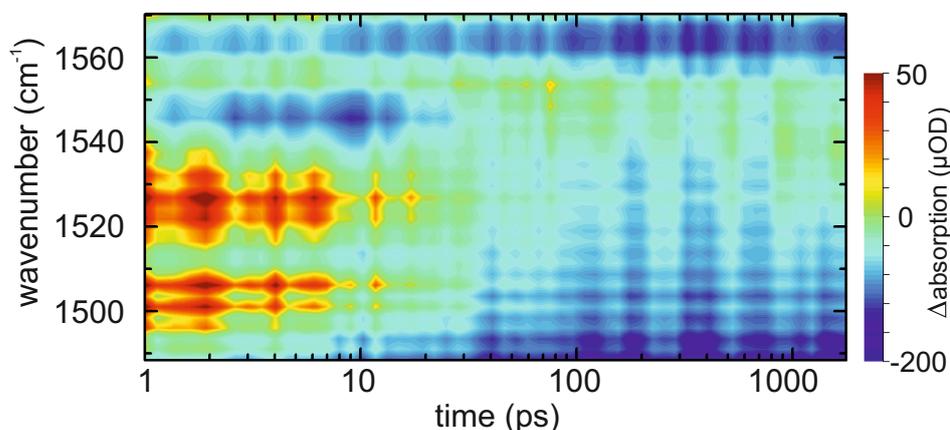


Abbildung 3.21: Ultrakurzzeitdynamik der photoinduzierten Deaktivierung der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante bei Anregung mit einem 390 nm-Laserimpuls. Dargestellt ist der Spektralbereich von 1490-1570  $\text{cm}^{-1}$ .

In Abbildung 3.21 ist der transiente Verlauf im Spektralbereich um 1530- $\text{cm}^{-1}$  von 1 ps bis 1,8 ns dargestellt. Zu frühen Verzögerungszeiten finden sich vier signifikante Signaturen. Zwei positive Banden um 1525  $\text{cm}^{-1}$  und um 1505  $\text{cm}^{-1}$  sind nach einigen wenigen 100 ps wieder verschwunden. Bei 1549  $\text{cm}^{-1}$  erscheint eine negative Bande, die mit ähnlichem zeitlichen Verhalten wieder verschwindet. Das deutlichste Signal befindet sich bei etwa 1565  $\text{cm}^{-1}$ . Dort zeigt sich eine negative, nicht abfallende Bande.

Dieser Datensatz (ausgenommen ist hierbei das Artefakt einige hundert Femtosekunden im Bereich des Zeitnullpunkts) wurde mit drei Zeitkonstanten gefittet: 40 ps, 1 ns und eine Unendlichkeit. Die DAS-Spektren zu den beiden ersten Lebensdauern sind in Abbildung 3.22 b) dargestellt. Das

40 ps Spektrum beschreibt den Zerfall der positiven Signale bei  $1525\text{ cm}^{-1}$  und  $1505\text{ cm}^{-1}$  und gleichzeitig eine Absorptionzunahme im Bereich von  $1554\text{ cm}^{-1}$ . Diese Absorptionsbande fällt schließlich mit einer 1 ns-Zeitkonstante wieder ab, wie es das Maximum des entsprechenden DAS-Spektrums deutlich macht. Aus diesem Zerfall wiederum entsteht ein neues Photoprodukt bei  $1537\text{ cm}^{-1}$ .

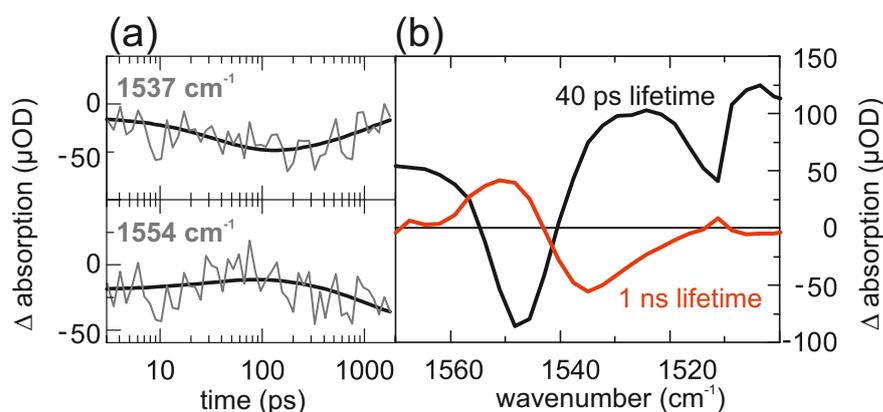


Abbildung 3.22: a) Transiente Absorptionsänderungen bei  $1537\text{ cm}^{-1}$  und  $1554\text{ cm}^{-1}$  (grau) mit den Fits (schwarz) aus der GLA-Analyse. b) Zerfallsassoziierte Spektren aus der GLA-Analyse.

Die Transienten bei  $1537\text{ cm}^{-1}$  und  $1554\text{ cm}^{-1}$  sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Die schwarze Kurve beschreibt jeweils den Fit. Auch hier zeigt sich deutlich der soeben beschriebene 1 ns-Prozess. Es ist aus anderen Studien bekannt, dass die C=C-Streckschwingung des Retinals im Grundzustand in einer  $\text{D}_2\text{O}$ -Umgebung bei  $1537\text{ cm}^{-1}$  in Erscheinung tritt [67, 68, 129]. Die beobachtete Absorptionzunahme an dieser spektralen Position deutet folglich darauf hin, dass der Grundzustand des Retinals mit einer Zeitkonstante von 1 ns zurückkehrt. Dieses Ergebnis deckt sich mit der entsprechenden Kinetik der 525 nm-Signatur im sichtbaren Bereich.

Im sichtbaren Bereich wurde beobachtet, dass die Absorptionzunahme bei 525 nm mit einer Absorptionsabnahme bei 460 nm korreliert ist. Ein dazu analoges Ergebnis findet sich in der bereits geschilderten Dynamik bei  $1537\text{ cm}^{-1}$  und  $1554\text{ cm}^{-1}$  wieder. Es liegt demnach nahe, dass das Photoprodukt bei  $1554\text{ cm}^{-1}$  mit der Signatur bei 460 nm und somit mit dem  $\text{M}'$ -Intermediat korreliert sein sollte.

Tabelle 3.1: Auflistung charakteristischer Zahlenwerte verschiedener Intermediate (Spalte 1) des Proteorhodopsin-E108Q-Photozyklus. 2. Spalte: Wellenlänge des Absorptionsmaximums. 3. Spalte: Experimentell gefundener Zahlenwert für die Wellenzahl der C=C-Streckschwingung. 4. Spalte: Inter- beziehungsweise extrapoliertes Wert der C=C-Streckschwingung auf Basis der bekannten Zahlenwerte des Grundzustands und des M-Intermediats (siehe Text).

Zustand	Wellenlänge (nm)	C=C-Schwingung (cm <sup>-1</sup> )	
		experimentell	berechnet
Grundzustand	520	1538	
M-Intermediat	400	1568	
K-Intermediat	588	1521	1521
M'-Intermediat	460	1553	1554

Es ist bekannt, dass die spektrale Position der C=C-Streckschwingung des Retinals im Allgemeinen invers zu dessen Absorptionsmaximum des elektronischen Übergangs korreliert ist [126, 155]. Je höher die Wellenlänge  $\lambda_{max}$  des elektronischen Übergangs des Retinals, desto kleiner ist die Wellenzahl  $\bar{\nu}$  für die C=C-Streckschwingung zu erwarten. Verwendet man den linearen Ansatz

$$\lambda_{max} = \alpha\bar{\nu} + \beta, \quad (3.4)$$

dann lassen sich die unbekanntenen Koeffizienten  $\alpha$  und  $\beta$  über zwei bekannte Wertepaare bestimmen. Dazu werden die entsprechenden Zahlenwerte des Grundzustandes und des M-Intermediates herangezogen (siehe Tabelle unten). Daraus ergeben sich die Werte  $\alpha = -4 \text{ nm/cm}^{-1}$  und  $\beta = 6672 \text{ nm}$ . Diese Funktion kann nun zur Verifizierung der Methode verwendet werden, indem die Wellenlänge der Absorptionsbande des K-Intermediats über die experimentell ermittelte und über Literatur bekannte spektrale Position der entsprechenden C=C-Streckschwingung ( $1521 \text{ cm}^{-1}$ ) errechnet wird. Es ergibt sich der Wert 588 nm, was sehr gut mit dem experimentell gefundenen Maximum bei 590 nm übereinstimmt (siehe Abbildungen 3.14 und 3.15). Nun lässt sich die Wellenzahl für die C=C-Streckschwingung des Chromophors im M'-Intermediat interpolieren, was eine spektrale Position von  $1553 \text{ cm}^{-1}$  liefert, was nahezu perfekt mit der Signatur bei  $1554 \text{ cm}^{-1}$  übereinstimmt. Aus diesem Grund, wird diese beobachtete Dynamik der C=C-Streckschwingung des Retinals im M'-Intermediat zugeschrieben. Eine Auflistung der soeben geschilderten errechneten und experimentell gefundenen Werte ist in Tabelle 3.1 gegeben.

In Abbildung 3.23 ist der transiente Verlauf im Spektralbereich um  $1590\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Die markantesten Signaturen bestehen aus zwei Minima bei etwa  $1562\text{ cm}^{-1}$  und  $1610\text{ cm}^{-1}$  und einem spektral sehr breiten positiven Signal um  $1590\text{ cm}^{-1}$ , welches nach etwa  $100\text{ ps}$  bis  $200\text{ ps}$  abklingt.

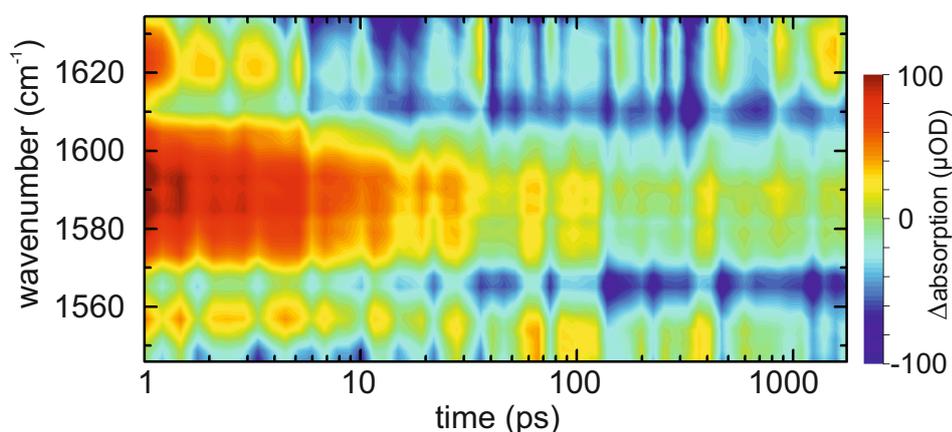


Abbildung 3.23: Ultrakurzzeitdynamik der photoinduzierten Deaktivierung von der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante bei Anregung mit einem  $390\text{ nm}$ -Laserimpuls. Dargestellt ist der Spektralbereich von  $1545\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$ .

Der beste Fit wurde mit drei Zeitkonstanten erreicht:  $15\text{ ps}$ ,  $1,1\text{ ns}$  und eine Unendlichkeit. Deren zerfallsassoziierte Spektren sind in Abbildung 3.24 gegeben. Die Analyse dieses Datensatzes ist nur in begrenztem Maße möglich, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis relativ klein ist. Nichtsdestotrotz lassen sich wichtige Beobachtungen machen. So zeigt sich im zerfallsassoziierten Spektrum bezüglich der Unendlichkeit neben den zwei bereits erwähnten Minima auch ein lokales Maximum bei etwa  $1628\text{ cm}^{-1}$ . Das Minimum bei etwa  $1565\text{ cm}^{-1}$  wurde bereits in der vorangegangenen Messung diskutiert und identifiziert (siehe Abbildung 3.21). Es handelt sich um das Bleichen der  $\text{C}=\text{C}$ -Streckschwingung des Retinals im Grundzustand. Das zweite Minimum kann ebenfalls der Absorptionscharakteristik des Grundzustands zugeordnet werden, wie ein Vergleich mit der FTIR-Messung in Abbildung 3.20 verdeutlicht. An der spektralen Position  $1628\text{ cm}^{-1}$  findet das Spektrum zur  $1,1\text{ ns}$ -Lebensdauer ein signifikantes Minimum. Die transiente Absorption bei  $1628\text{ cm}^{-1}$  ist in Abbildung 3.24 links aufgetragen.

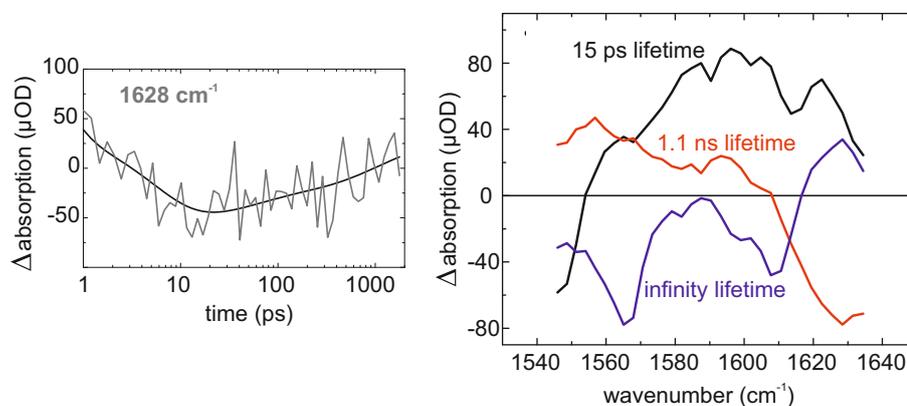


Abbildung 3.24: Links: Transiente Absorptionsänderung bei  $1628 \text{ cm}^{-1}$  (grau) mit Fit (schwarz) aus der GLA-Analyse. Rechts: Zerfallsassozierte Spektren aus der GLA-Analyse.

Es ist aus vorangegangenen Studien bekannt, dass an dieser spektralen Position die C=N-Streckschwingung des Retinals im Grundzustand erscheint [67, 68, 129]. Demgemäß lässt sich die Beobachtung dieser positiven Signatur der Rückkehr der C=N-Streckschwingung des Grundzustands mit einer 1,1 ns-Zeitkonstanten zuordnen, was genau der beobachteten Kinetik der entsprechenden C=C-Streckschwingung entspricht.

Die spektrale Struktur der schnellen Zeitkonstante deutet darauf hin, dass die breite, positive Bande um  $1590 \text{ cm}^{-1}$  im zweistelligen Pikosekundenbereich abfällt. Vermutlich handelt es sich hierbei um Kühlprozesse.

Im Spektralbereich von etwa  $1600 \text{ cm}^{-1}$  und  $1700 \text{ cm}^{-1}$  erscheinen überwiegend C=O-Schwingungen des Proteins, die auch als Amid I-Resonanzen bezeichnet werden [60, 66, 67, 156]. In schwächerem Maße lässt sich auch die C=N-Streckschwingung detektieren, sofern diese nicht mit der sehr stark ausgeprägten Amid I-Hauptbande überlappt. Die zeitaufgelöste Absorptionssmessung dieses spektralen Sektors ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

Das Minimum bei etwa  $1612 \text{ cm}^{-1}$  wurde bereits in Abbildung 3.23 detektiert und als eine Absorptionsbande des Grundzustands zugeordnet. Die zu späten Verzögerungszeiten erscheinende Absorptionzunahme im Bereich um  $1628 \text{ cm}^{-1}$  lässt sich auch hier beobachten. Dieses Signal erscheint in

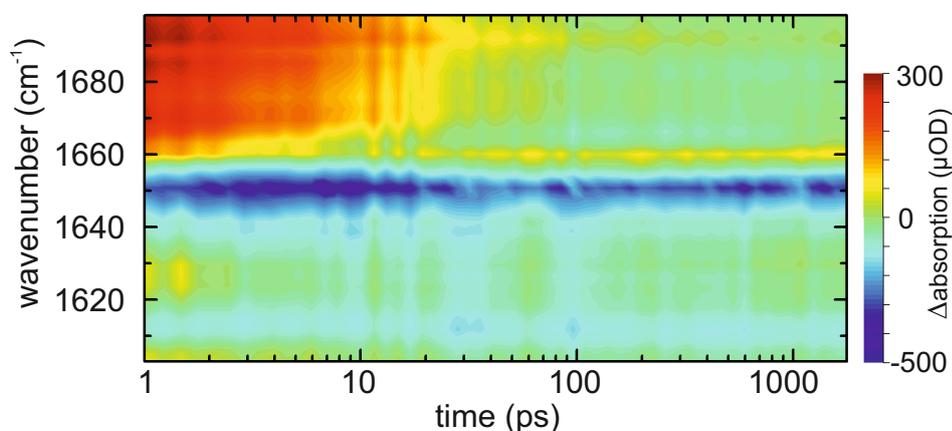


Abbildung 3.25: Ultrakurzzeitdynamik der photoinduzierten Deaktivierung der Proteorhodopsin-E108Q-Mutante bei Anregung mit einem 390 nm-Laserimpuls. Dargestellt ist der Spektralbereich von 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  [124].

diesem Farbcode sehr schwach, da die Signaturen im Bereich um  $1650 \text{ cm}^{-1}$  wesentlich höhere Amplituden haben. Das Signal bei  $1628 \text{ cm}^{-1}$  wurde als C=N-Streckschwingung des Retinals im Grundzustand identifiziert. Bei  $1650 \text{ cm}^{-1}$  erscheint ein ausgeprägt negatives Signal. Spektral dazu verschoben befindet sich in der FTIR-Messung das dominante Minimum bei etwa  $1658 \text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 3.20). Eine Erklärung für diesen Versatz ist die Präsenz der positiven Absorptionsbande bei  $1662 \text{ cm}^{-1}$ . Diese Signatur überlappt mit der Bleichbande und verschiebt dadurch ihr Minimum zu kleiner werdenden Wellenzahlen hin. Diese Beobachtung wird als Versatz der Amid I-Bande interpretiert.

In Abbildung 3.26 sind auf der linken Seite die transienten Absorptionsänderungen bei  $1654 \text{ cm}^{-1}$  und  $1666 \text{ cm}^{-1}$  in grau aufgetragen. In schwarz ist der entsprechende Fit dargestellt. Deutlich zu erkennen ist hier das synchrone Verhalten bei diesen beiden spektralen Positionen: Das Signal bei  $1654 \text{ cm}^{-1}$  steigt zu Beginn an und nach etwa 100 ps bis 200 ps fällt es ab. Die Signatur bei  $1666 \text{ cm}^{-1}$  verhält sich dazu gegensätzlich. Erst fällt es ab, um sich zu späten Verzögerungszeiten wieder aufzubauen. Der zeitaufgelöste Datensatz, wie er in Abbildung 3.25 dargestellt ist, wird in der GLA-Analyse am sinnvollsten mit vier Zeitkonstanten beschrieben: 12 ps, 80 ps, 1 ns und eine Unendlichkeit. Das zerfallsassoziierte Spektrum zur 1 ns-Zeit hat ihre

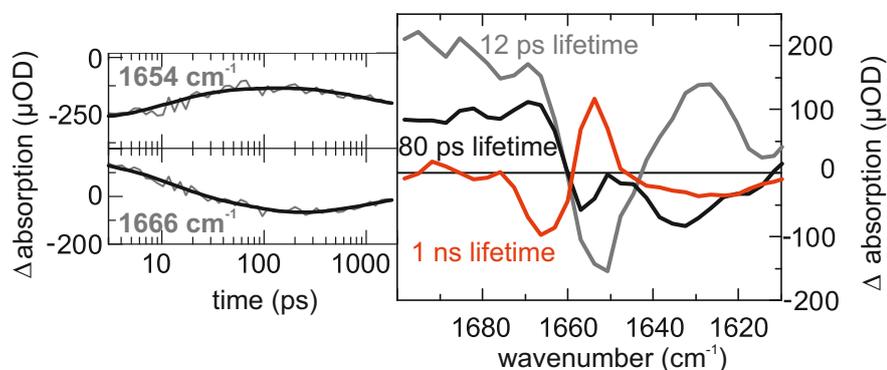


Abbildung 3.26: Links: Transiente Absorptionsänderungen bei  $1654 \text{ cm}^{-1}$  und  $1666 \text{ cm}^{-1}$  (grau) mit den Fits (schwarz) aus der GLA-Analyse. Rechts: Zerfallsassoziierte Spektren aus der GLA-Analyse[124].

beiden Extrema genau an den soeben beschriebenen spektralen Positionen bei  $1654 \text{ cm}^{-1}$  und  $1666 \text{ cm}^{-1}$ . Die zeitlich späte Dynamik dieser Positionen kann folglich mit einer 1 ns-Kinetik beschrieben werden. Somit ist dieser Prozess vermutlich mit dem Zerfall des  $M'$ -Intermediats zu assoziieren, wie es sowohl im sichtbaren Bereich, als auch für die C=C-Streckschwingung beobachtet werden konnte. Insofern kann diese Dynamik als eine Reaktion des Proteins zu Konformationsänderungen interpretiert werden, die mit dem Entstehen und dem Zerfall des  $M'$ -Intermediats korreliert.

Ab etwa  $1660 \text{ cm}^{-1}$  bis etwa  $1700 \text{ cm}^{-1}$  (Ende des Messbereichs), zeigt sich eine sehr breite positive Signatur im transienten Verlauf (siehe Abbildung 3.25). Diese ist nach etwa 100 ps wieder abgefallen. Dieser Zerfall wird in den DAS-Spektren mit zwei Zeitkonstanten von 12 ps und 80 ps beschrieben. Dieser Prozess kann - wie bei einigen transienten Messungen zuvor bereits beobachtet - aus einem Kühlprozess resultieren. Allerdings zeigt sich in den DAS-Spektren auch, dass mit der schnelleren Zeitkonstante das Photoprodukt bei  $1654 \text{ cm}^{-1}$  zu entstehen scheint, welches später wieder mit 1 ns zerfällt. Um was für eine Schwingung es sich hierbei handelt, ist schwierig zu entscheiden, da in dieser spektralen Region sowohl C=N-Streckschwingungen erscheinen können, als auch die Amid I-Bande detektiert wird.

### 3.4.5 Die Reprotonierung der Schiff'schen Base

Der zweite Schritt nach der Reisoomerisierung in der BLQ-Dynamik muss notwendigerweise die Reprotonierung der Schiff'schen Base des Retinals sein. Die C=N-Schwingungsmode des Retinals ist beeinflusst vom Protonierungszustand der Schiff'schen Base. Im vorangegangenen Teil konnte gezeigt werden, dass die C=N-Streckschwingung des Grundzustands mit 1 ns im Zuge der BLQ-Dynamik zurückkehrt. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem vielfältig beobachteten 1 ns-Prozess tatsächlich um den Schritt der Reprotonierung handelt.

Die Frage ist nun, wie diese Reprotonierung stattfindet. Welcher Aminosäurerest reprotoniert die Schiff'sche Base?

Das Gegenion der Schiff'schen Base im Grundzustand ist der deprotonierte Rest vom primären Protonenakzeptor D97[88] (bei alkalischer Umgebung). Dieser wird im Zuge der Bildung des M-Intermediats protoniert. Folglich kann es sein, dass D97 sein Proton photoinduziert an die Schiff'sche Base zurückgibt. Um dies zu überprüfen, wurde zusätzlich die BLQ-Photodynamik im Spektralbereich detektiert, in der die C=O-Streckschwingung des D97-Restes erscheint. Diese lässt sich bei  $1743\text{ cm}^{-1}$  detektieren [60, 67, 129]. Mit einer Deprotonierung des D97-Restes, würde diese Schwingungsbande verschwinden. Gleichzeitig wäre dann zu erwarten, dass eine symmetrische COO-Schwingungsmode aufkommen sollte. Dessen spektrale Position liegt allerdings unterhalb von etwa  $1400\text{ cm}^{-1}$  [69], was außerhalb des detektierten Spektralbereichs im Experiment liegt.

Der transiente Verlauf in der spektralen Region der C=O-Streckschwingung von D97 ist in Abbildung 3.27 a) dargestellt. In Abbildung 3.27 c) sind Spektren von a) zu den Verzögerungszeiten 0,1, 0,5, 0,6, 1, 1,2, 1,5 und 1,8 ns aufgetragen (von hellgrau zu schwarz). In 3.27 b) ist das Spektrum aus a) zur Verzögerungszeit 1,8 ns gegeben. Der gestrichelte Verlauf ist das dazu normierte FTIR-Differenzspektrum (Absorption des Grundzustands minus Absorption des M-Intermediats).

Die größte Signatur im transienten Datensatz ist die Bleichbande bei  $1743\text{ cm}^{-1}$ . Diese bestätigt den Verdacht, dass die C=O-Streckschwingung von D97 verschwindet. Die spektrale Form dieser Signatur stimmt mit der entsprechenden Absorptionsbande des M-Intermediats in der FTIR-Messung

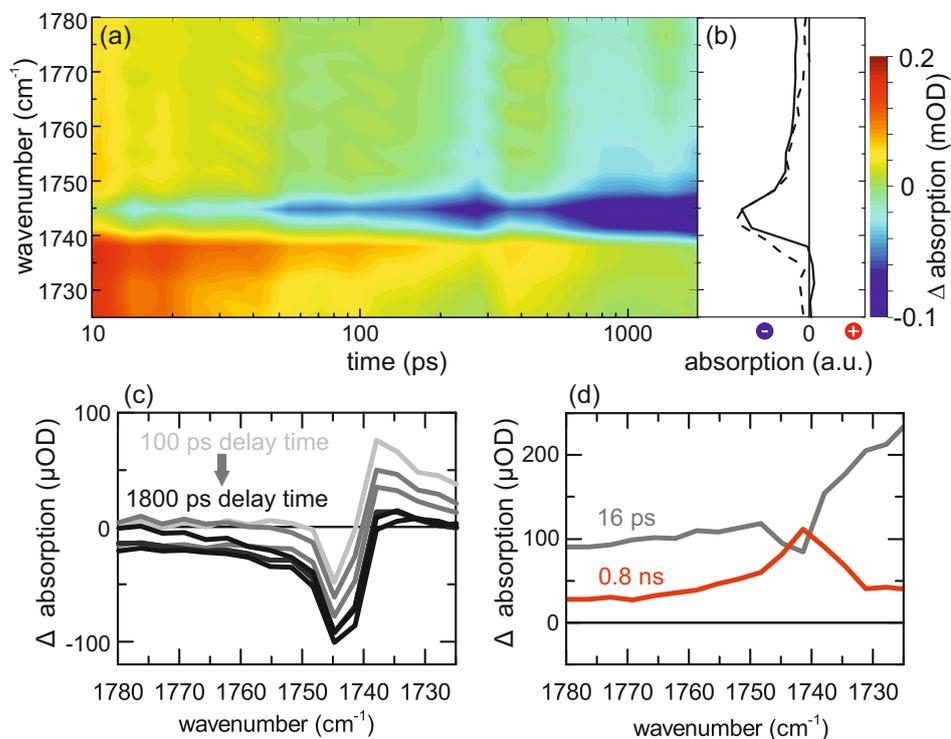


Abbildung 3.27: Transiente Absorptionsänderung der C=O-Streckschwingung des D97-Restes bei pD 8,5 in  $D_2O$  nach Photoanregung (390 nm) des M-Intermediates der PR-E108Q-Mutante. (a) 2D-Darstellung der Ultrakurzzeitmessung (rot: positive Absorption, blau: negative Absorption). (b) Durchgezogene Linie: Normalisierte Absorptionsänderung von 1,8 ns-Verzögerungszeit. Gepunktete Linie: Normalisiertes FTIR-Differenzspektrum vom Grundzustand minus der M-Intermediatsabsorption. (c) Spektren von (a) bezüglich folgender Verzögerungszeiten (von grau nach schwarz): 0,1 ns, 0,5 ns, 0,6 ns, 1 ns, 1,2 ns, 1,5 ns und 1,8 ns. (d) Zerfallsassoziierte Spektren von der GLA-Analyse.

überein (siehe Abbildung 3.27 b). Spektral angrenzend an die transiente Bleichbande ist eine zeitlich kleiner werdende, positive Absorptionsbande bei  $1738\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Diese wird als bathochrom verschobene Absorption der C=O-Streckschwingung im M'-Zustand interpretiert.

Die GLA-Analyse dieses transienten Datensatzes liefert eine Kinetik bestehend aus zwei Zeitkonstanten: 16 ps und 0,8 ns. Das DAS-Spektrum der 16 ps-Zeit (siehe Abbildung 3.27 c) beschreibt einen Zerfall über den gesamten spektralen Detektionsbereich. Vermutlich wird hierbei ein Kühlprozess von heißen Banden beobachtet. Das rote DAS-Spektrum zur 0,8 ns-Zeitkonstante weist ein Maximum bei  $1741\text{ cm}^{-1}$  auf. Diese Kinetik wird der

Zerfallsdynamik der C=O-Streckschwingung von D97 zugeschrieben. Die konsequente Interpretation dieser Beobachtung ist, dass ein Protonentransfer vom D97-Rest zur Schiff'schen Base stattfindet.

### 3.4.6 Fazit

Mit der E108Q-Mutante gelang es, die ultraschnelle Photodynamik des BLQ-Prozesses von Proteorhodopsin zu detektieren. Diese Studie zeigt, dass die photoinduzierte Inhibition des Protonenpumpprozesses und die Rückkehr zum Grundzustand dieses Retinalproteins auf einer Nanosekundenzeitskala geschieht. Das Retinal wird dabei zunächst in Pikosekunden von der 13-*cis* (M-Zustand) zur all-*trans* ( $M'$ -Zustand) Konformation reisoimerisiert. Anschließend erfolgt auf einer Nanosekundenzeitskala die Reprotonierung der Schiff'schen Base durch die Deprotonierung des D97-Restes. Der BLQ-Prozess ist schematisch in Abbildung 3.28 dargestellt.

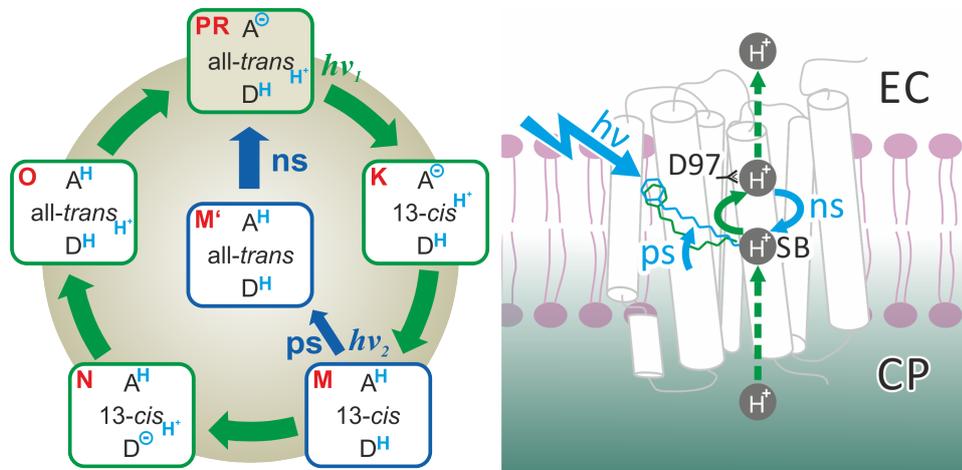


Abbildung 3.28: Links: Schema des Photozyklus von Proteorhodopsin (grüne Pfeile) inklusive des photoinduzierten Deaktivierungspfad über  $M'$  (blaue Pfeile). A steht für den primären Protonenakzeptor und D für den primären Protonendonator. Rechts: Schema der BLQ-Dynamik in der Proteorhodopsinstruktur[124].

Dass dieser Protonentransfer vom primären Protonenakzeptor ausgeht, wurde auch bei Bakteriorhodopsin festgestellt (D85). Das D85 befindet sich sowohl im Grundzustand als auch im M-Intermediat mit einer Distanz von unter 5 Å in unmittelbarer Nähe zur Schiff'schen Base[86, 157]. Eine ul-

traschnelle Reprotonierung der Schiff'schen Base ausgehend vom primären Protonenakzeptor ist insofern plausibel. Allerdings erfolgt dieser Schritt bei Proteorhodopsin zwei Größenordnungen schneller als bei Bakteriorhodopsin. Außerdem ist der spektrale Abstand zwischen dem M' und dem M-Intermediat mit 50 nm wesentlich größer als bei Bakteriorhodopsin (15 nm). Diese Beobachtungen könnten damit zusammenhängen, dass der  $pK_S$ -Wert des primären Protonenakzeptors D97 signifikant höher ist als der von Bakteriorhodopsin[60].

Im GPR-Photozyklus erfolgt die Reprotonierung der Schiff'schen Base von der zytoplasmatischen Seite über den primären Protonendonator E108. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Reprotonierungsschritt in der BLQ-Dynamik vom primären Protonenakzeptor und folglich von der extrazellulären Seite geschieht. Die Photoisomerisierung des 13-*cis*-Retinals mit deprotonierter Schiff'schen Base zum all-*trans* führt folglich zu einem Umschalten[101, 151] in der Orientierung der Schiff'schen Base und zu einer Umkehr der Protonentransferrichtung.

Es wurde gezeigt, dass sich der BLQ-Effekt auf ultraschneller Zeitskala mit der Donormutante E108Q untersuchen lässt. Dieses Konzept lässt sich möglicherweise auch auf weitere Systeme anwenden. Speziell bei Channelrhodopsinen ist der BLQ-Effekt besonders interessant für optogenetische Anwendungen. Denn die gleichzeitige Kontrolle sowohl der Ionenkanalöffnung als auch -schließung durch Licht, würde die Präzision in lichtgesteuerter Ionenregulierung erheblich verbessern.



## Kapitel 4

# Visuelles Rhodopsin

Dieses Kapitel widmet sich der Photodynamik von visuellem, bovinem Rhodopsin. Rhodopsin gehört zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Es ist das bislang am besten untersuchte System der GPCR-Familie. Viele Erkenntnisse dieses Retinalproteins lassen sich auf die Funktionsweise der GPCRs generalisieren, was Rhodopsin zu einem bedeutenden Vertreter dieser Proteinfamilie macht.

Im Folgenden wird zunächst auf GPCRs im Allgemeinen eingegangen und anschließend das visuelle Rhodopsin beschrieben.

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, inwiefern Arrestin - ein Protein, welches die Signaltransduktion des GPCR deaktivieren kann - die Photodynamik von Rhodopsin beeinflusst und welche physiologische Rolle es in der Retinalhomöostase und somit auch in der Rhodopsinregenerierung einnimmt. Bevor die Ergebnisse zu dieser Studie vorgestellt werden, wird die Struktur und die Funktionsweise von Arrestin erläutert.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels wird zum einen die Rhodopsinmutante G90D vorgestellt, die mit kongenitaler (angeborener) stationärer Nachtblindheit assoziiert wird und zum anderen die Kinetik des Photozerfalls einer Doppelmutante (N2C und D282C) untersucht, welche durch die Einführung zweier Cysteine im extrazellulären Bereich zur Bildung einer stabilisierenden Disulfidbrücke führt. Die Photodynamiken dieser Mutanten und die des Wildtyps wurden sowohl auf der Minutenskala als auch in der frühen Photoreaktion bis etwa 2 ns im UV-Vis-Bereich untersucht. Diese Messungen werden erläutert und vergleichend diskutiert.

## 4.1 GPCR

Um das Überleben von vielzelligen Organismen zu ermöglichen, ist die Koordination diverser physiologischer Prozesse über chemische Signale essentiell. Die Funktion solcher Signalmoleküle ist dabei im Allgemeinen extrem vielfältig. Die Ausschüttung des Hormons EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) beispielsweise aktiviert das Wachstum und die Teilung von Zellen. Insulin wiederum verändert mitunter die Glucoseaufnahme vom Blut und die Speicherung von Glykogen.

All diese chemischen Signale entstehen aus einem Reiz heraus. Der Reiz kann dabei beispielsweise die Aufnahme von Nahrung sein, eine Wunde oder die Wahrnehmung von Gefahr. Die dabei ausgeschütteten Signalmoleküle werden primäre Botenstoffe genannt. Diese manipulieren den Betrieb einer Zelle meist nur indirekt. Denn primäre Botenstoffe werden in der Regel außerhalb der Zelle in der Zellmembran durch Rezeptoren gebunden. Diese Transmembranproteine wiederum aktivieren sekundäre Botenstoffe wie zyklisches AMP (Adenosinmonophosphat) oder zyklisches GMP (Guanosinmonophosphat) innerhalb der Zelle. Diese Reaktionskette wird Signaltransduktion genannt.

Die größte Klasse von Rezeptoren in der Zellmembran sind die sogenannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Abkürzung: GPCRs, engl. G-Protein Coupled Receptors). Ein G-Protein wiederum ist ein Guanylnukleotid bindendes Protein. Das Aufgabengebiet der GPCRs ist sehr breit. So sind sie mitunter für diverse sensorische Prozesse wie Sehen, Schmecken und Riechen von zentraler Bedeutung. Allein beim Menschen konnten bisher etwa 800 GPCRs gefunden werden [158]. Nur von den Wenigsten unter ihnen ist bisher die physiologische Funktion bekannt, weshalb die meisten GPCRs als sogenannte Orphan-GPCRs bezeichnet werden [159].

Die Superfamilie der GPCRs wird in der sogenannten GRAFS (Glutamat, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled, Secretin)[160] Klassifikation in fünf Gruppen unterteilt. Allen gemeinsam ist der Aufbau aus sieben transmembranen Domänen (TMD), die durch Schleifen verbunden sind. Der N-Terminus ist dabei extrazellulär, während sich der C-Terminus innerhalb der Zelle befindet.

Die bei Weitem größte und am besten untersuchte Gruppe ist mit über

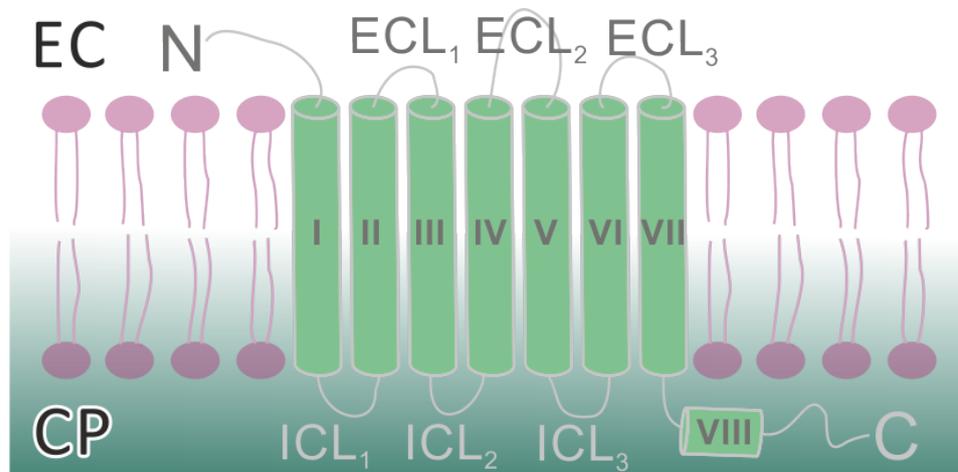


Abbildung 4.1: Schematische Skizze eines GPCR-Rezeptors, bestehend aus sieben transmembranen Helices und einer kurzen Helix. Die Helices sind mit römischen Ziffern nummeriert. Abkürzungen: EC (Extrazellulär); CP (Zytoplasma); ECL (Extrazelluläre Schleifen); ICL (Intrazelluläre Schleifen).

85 % die der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (701 GPCRs). Sie zeichnet sich durch einige hochkonservierte Aminosäuren aus, die entscheidend für die Struktur und Funktion sind. So ist beispielsweise das DRY-Motiv innerhalb dieser Familie hochkonserviert. Es befindet sich an der dritten TMD und ist für die Aktivierung des G-Proteins von Bedeutung.

#### 4.1.1 Signaltransduktion über GPCRs

Wie im vorangegangenen Teil bereits erwähnt, ist an einem GPCR ein G-Protein gebunden. Bei einem 7TM-Rezeptor ist das heterotrimere G-Protein im inaktiven Zustand wiederum an GDP (Guanosindiphosphat) gebunden[161]. Das G-Protein lässt sich weiter unterteilen in die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ .

Der  $\alpha$ -Teil (auch  $G_\alpha$  genannt) gehört zur Gruppe der P-Schleife-NTPasen (NTP: Nucleosidtriphosphat), an dessen P-Schleife das GDP bindet. Die Untergruppen  $\alpha$  und  $\gamma$  sind über Fettsäuren mit der Membran verbunden. In diesem inaktiven Zustand wartet nun der Rezeptor auf ein Signal. Dieses Signal kann sehr unterschiedlich aussehen. Von Hormonen zu Duftstoffen, Geschmacksstoffen bis hin zu einem Photon ist die vielfältige Gestalt des Si-

gnalreizes bekannt [162]. Der Ligand bindet nun an den Rezeptor. Dies löst konformationelle Änderungen des GPCR aus. Die zytoplasmatische Seite ist am stärksten von diesen Änderungen betroffen, was einen zweiten Prozess am G-Protein triggert: Das GDP löst sich vom G-Protein, woraufhin ein GTP (Guanosintriphosphat) daran bindet. Zeitgleich entkoppeln sich die  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheiten als Dimer vom  $G_\alpha$ -Rest [163].

Die separierte  $G_\alpha$ -Untereinheit und das  $\beta\gamma$ -Dimer können nun weitere Wechselwirkungen mit anderen Proteinen innerhalb der Zelle eingehen. So kann  $G_\alpha$  an das Membranprotein Adenylatcyclase binden [164]. Dies katalysiert die Umwandlung von ATP (Adenosintriphosphat) zu cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat).

Das cAMP beeinflusst zahlreiche Prozesse in der Zelle. Dies wird in sehr vielen Fällen durch aktivierte Proteinkinase A (PKA) ermöglicht. Diese entsteht durch die Wechselwirkung von inaktiver Proteinkinase A mit cAMP. Diese Prozesse sind in Anlehnung an [165] in Abbildung 4.2 illustriert.

Um das GPCR wieder inaktiv und sensitiv für neue Liganden werden zu lassen, wird das GTP über das Enzym GTPase zu GDP konvertiert[166], woraufhin das  $\beta\gamma$ -Dimer wieder an die  $G_\alpha$ -Einheit binden kann.

#### 4.1.2 Struktur von GPCRs

Der initiale und entscheidende Schritt für die Signalweiterleitung in die Zelle, ist die Wechselwirkung des Liganden mit dem jeweiligen GPCR. Um diesen Prozess verstehen zu können, sind strukturelle Kenntnisse des GPCR von grundlegender Wichtigkeit.

Die erste Kristallstruktur eines GPCR gelang im Jahre 2000 [167]. Palczewski et al. konnten die Struktur von bovinem Rhodopsin mit einer Auflösung von 2,8 Å entschlüsseln. Im Jahre 2007 gelang es dann, die Kristallstruktur eines zweiten GPCR mit einer Auflösung von 2,4 Å zu ermitteln: der menschliche  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_2$ -AR)[168]. Im Laufe der Jahre folgten zahlreiche weitere Studien zu der Struktur von GPCRs. Neben vertebratem Rhodopsin[167, 169] konnte 2008 auch die Struktur von invertebratem Rhodopsin erstmals bestimmt werden[170]. Die erste Studie basierend auf NMR (engl. Nuclear Magnetic Resonance, deutsch: Kernspinresonanz) erfolgte 2012[171]. Aktuell gibt es weit über 100 Kristallstrukturen dieser

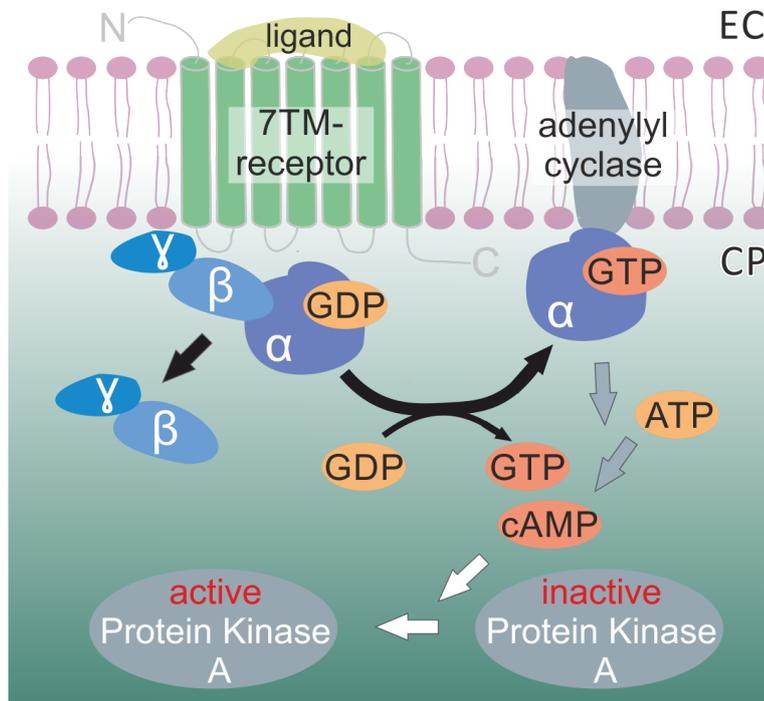


Abbildung 4.2: Schematische Skizze der Signaltransduktion eines 7TM-Rezeptors.

Proteinklasse[172].

Um die Funktionsweise und den Aufbau von GPCRs zu verstehen, ist die Kristallstruktur nicht nur vom inaktiven Zustand wichtig, sondern auch die des aktiven Zustands beziehungsweise des Übergangs von aktiv zu inaktiv. Die erste Kristallstruktur dieser Art wurde 2008 publiziert[173]. In den Folgejahren gelang es, weitere Kristallstrukturen von aktivem beziehungsweise aktivierendem bovinem Rhodopsin zu bestimmen[174–176]. Neben bovinem Rhodopsin, gelang dies auch für einige weitere GPCRs: menschliches  $\beta_2$ -AR[177, 178] und  $A_{2A}R$ [179, 180] und NTSR1 von der Ratte[181].

Die Struktur von GPCR lässt sich in drei Sektoren unterteilen: Die extrazelluläre und die intrazelluläre Region und der transmembrane (TM) Bereich. Der erste Sektor besteht im Wesentlichen aus dem N-Terminus und den Schleifen, die die sieben  $\alpha$ -Helices verbinden, aus denen der TM-Bereich besteht. Intrazellulär finden sich die übrigen drei Schleifen des Rezeptors, eine achte amphipathische Helix und schließlich der C-Terminus des Proteins. Die extrazelluläre Region lässt sich in zwei verschiedene Typen unterscheiden. Entweder hat sie eine Gestalt, durch die die Ligandenbindetasche (LBT)

geblockt ist (Typ 1) oder sie ist so strukturiert, dass sie die Zugänglichkeit von Wasser zur LBT ermöglicht (Typ 2). Im Falle von Rhodopsin handelt es sich um eine Typ 1-extrazelluläre Region. Es wird vermutet, dass dadurch verhindert wird, dass hydrophobe Liganden durch die Membran kommend an den Rezeptor binden könnten[182]. MD (Molekulardynamik) Simulationen und andere Studien deuten darauf hin, dass die Schleife ECL2 (siehe Abbildung 4.1) eine Schlüsselrolle in der Erkennung von Liganden beziehungsweise in der gesamten frühen Kinetik der Ligandenbindung spielt[183–186]. Dies erklärt auch das wesentlich größere Raumvolumen, welches ECL2 (verglichen mit den anderen zwei Schleifen) einnimmt[187].

Die ECL2 Schleife trägt außerdem zur Stabilität des gesamten Rezeptors bei. So wird zwischen TM 3 und dieser eine hochkonservierte Disulfidbrücke beobachtet. Aus vermutlich funktionellen Gründen befindet sich in GPCRs häufig eine weitere Disulfidbrücke innerhalb der Schleife ECL3. Diese Beeinträchtigung in der Bewegungsfreiheit könnte zum Vorteil einer effizienten Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung sein.

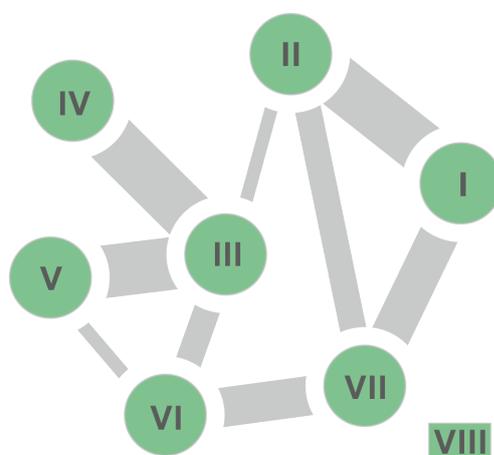


Abbildung 4.3: Graphik zur Illustration interhelikaler Wechselwirkungen in einem GPCR. Diese bestehen aus insgesamt 24 Verbindungen zwischen Aminosäuren verschiedener transmembranärer Helices. Die Dicke der grauen Balken skaliert mit der Anzahl an Verbindungen zwischen jeweils zwei TM-Helices. Diese Graphik wurde in Anlehnung an [188] erstellt.

Im TM-Bereich gibt es 24 Verbindungen zwischen verschiedenen Helices. An diesen Verbindungen sind 36 Aminosäuren an topologisch äquivalenten Positionen beteiligt. Diese Positionen scheinen für die Funktionsweise wichtig

zu sein, da bei Mutationen an 24 dieser 36 Aminosäuren eine beeinträchtigte Rezeptoraktivität beobachtet wird[189].

Bei den Helices I und II erfolgen keine größeren Konformationsänderungen nach der Aktivierung des Rezeptors. Es wird angenommen, dass diese eher für Schritte wie den Faltungsprozess eine Rolle spielen[190]. Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich, geht TM3 die meisten Verbindungen mit anderen Helices ein. Die Wechselwirkungen mit TM4 und TM6 sind vorwiegend auf mittlerer Höhe der Helices, während die Verbindungen mit TM5 und TM2 eher auf der zytoplasmatischen Seite liegen. TM3 zeichnet sich außerdem von den anderen Helices dadurch aus, dass es mit einer verhältnismäßig großen Neigung gegenüber den anderen orientiert ist ( $35^\circ$ ). Aus diesen Gründen wird TM3 oft als strukturelles Drehkreuz des GPCR interpretiert.

In der Gruppe Rhodopsin-ähnlicher GPCRs bilden meist konservierte Aminosäurepositionen in TM3, TM6 und TM7 die Ligandenbindetasche. Eine spezifische Ligandenbindung wird durch die Wahl der Aminosäuren an den topologisch äquivalenten Positionen gewährleistet. Es wird auch oft beobachtet, dass Wassermoleküle den Kontakt zwischen Ligand und Rezeptor ermöglichen[179, 180, 191, 192].

Im intrazellulären Bereich des Rezeptors findet die Kommunikation mit dem G-Protein und somit die Signalweiterleitung statt[193]. Darüberhinaus gibt es noch andere wichtige Proteine wie das Arrestin, das an Rhodopsin intrazellulär binden kann[178, 194]. Auf dieses deaktivierende Protein wird später noch detailliert eingegangen.

Es konnte gezeigt werden, dass in vielen GPCRs die mittlere Schleife auf der zytoplasmatischen Seite eine Salzbrücke mit der Asparaginsäure in TM3 des DRY-Motivs eingeht, was dazu führt, dass diese Schleife nach innen in Richtung Membranmitte gezogen wird[195]. Das DRY-Motiv an Helix 3 geht außerdem eine Salzbrücke mit Glutaminsäuren beziehungsweise Asparaginsäuren ein. Diese wird bei inaktiven Rezeptoren beobachtet und als ionischer Verschluss bezeichnet. Beim  $\beta_2$ -AR-Rezeptor wurde festgestellt, dass die mittlere Schleife auf der intrazellulären Seite an der Bindung vom G-Protein beteiligt ist, da es mit dem N-Terminus der  $G_\alpha$ -Untereinheit wechselwirkt[178]. Die Funktion von Helix 8 konnte bisher noch nicht völlig geklärt werden. Es wird vermutet, dass diese in der Bindung mit dem G-Protein involviert sei. Allerdings lässt sich dies bei Rezeptoren, die in Wechselwirkung mit heterotrimeren G-Proteinen treten, nicht bestätigen[178].

Die flexibelsten Teile auf der zytoplasmatischen Seite sind der C-Terminus des Rezeptors und die dritte Schleife ICL3 (siehe Abbildung 4.1)[187]. Beim  $\beta_2$ -AR finden in dieser Region Phosphorylierungen durch beispielsweise GPCR Rezeptor-Kinasen statt, die die Bindung von  $\beta$ -Arrestin am GPCR ermöglichen[196–198].

### 4.1.3 Strukturänderungen eines aktivierten GPCR

Um die Dynamik eines GPCR untersuchen zu können, sind weitere biochemische und biophysikalische Methoden, sowie theoretische Berechnungen/Simulationen heranzuziehen. Die bisher gewonnenen Kenntnisse basieren fast ausschließlich auf bovinem Rhodopsin und dem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor.

Die wichtigsten Veränderungen im extrazellulären Bereich von Rhodopsin sind zum einen die Umpositionierung der Helices TM3 und TM7 und zum anderen Translations- und Rotationsbewegungen von TM5 und TM6. Der Agonist von bovinem Rhodopsin ist ein Photon. Dieses führt zur Photoisomerisierung des im Protein kovalent gebundenen 11-*cis*-Retinals. Dieses Ereignis hat wiederum zur Folge, dass sich das Volumen der Bindetasche vergrößert[176]. Die größte Änderung schließlich erfolgt durch die Verlagerung von TM5 und TM6, was auch zur Bildung von neuen (nicht-kovalenten) Verbindungen zwischen diesen beiden Helices führt. Die Rotationsbewegung von TM6 führt schließlich zur Bildung einer Spalte, über die das G-Protein an den Rezeptor binden kann[199–203].

Wie bereits erwähnt, interagiert die mittlere Schleife auf der zytoplasmatischen Seite und TM3 mit dem G-Protein, nachdem der Rezeptor aktiviert wurde. Der ionische Verschluss zwischen ICL2 und TM3 wird somit aufgehoben.

Nachdem nun die Funktionsweise und Struktur eines GPCR erläutert wurde, wird im Folgenden speziell auf das bovine Rhodopsin detaillierter eingegangen.

## 4.2 Der GPCR-Photorezeptor Rhodopsin

Das Rhodopsin hebt sich in der Familie der GPCRs dadurch merklich ab, dass es keinen Liganden in Molekülform bindet, sondern durch Licht aktiviert wird[204]. Dieser spezielle Agonist wird von einem Retinal absorbiert, was schließlich über eine Photoisomerisierung zur Aktivierung des Rhodopsins führt[205].

In vertebraten, visuellen Systemen gibt es zwei Typen von Photorezeptorzellen, die Zapfen und Stäbchen.

Die Zapfen ermöglichen die Farbwahrnehmung. So kommt für jeden spektralen Bereich ein individueller Typ zum Einsatz. Der Mensch beispielsweise verfügt über eine trichromatische Wahrnehmung, bestehend aus drei Zapfentypen, die den blauen, grünen und roten Spektralbereich abdecken. Andere Lebewesen wie die Robbe nehmen monochromatisch wahr und sind somit farbenblind. Der Fangschreckenkrebs wiederum ist mit acht Rezeptortypen uns Menschen in dieser Hinsicht weit überlegen.

Die Stäbchen sind wesentlich sensitivere Photorezeptoren. Mit diesen wird die Hell-Dunkel-Wahrnehmung adaptiert.

Beide Rezeptortypen befinden sich auf der Retina im Auge. Die höchste Dichte an Zapfen befindet sich auf der Makula (auch Gelber Fleck genannt), während die Stäbchenzellen überall außerhalb dieses kleinen Gebietes zu finden sind, was peripheres Sehen erst ermöglicht. Diese Verteilung der Photorezeptoren auf der Retina erklärt auch, dass wesentlich mehr Stäbchen als Zapfen auf der menschlichen Retina vorzufinden sind (etwa 100 zu 5 Millionen)[206].

Um zu den Photorezeptorzellen zu gelangen, muss das Licht durch die gesamte Retina propagieren. Wenn ein Rezeptor schließlich durch Absorption eines Photons aktiviert wird, wird das Signal über verschiedene Zelltypen (Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen) zu den Ganglienzellen weitergeleitet. Diese führen das Signal in Form eines elektrischen Impulses zum Sehnerv. Dies ist in Abbildung 4.4 illustriert.

Die Stäbchen sitzen im Pigmentepithel. Dieses organisiert den Stoffwechsel des Retinals und den Abbau abgestorbener Rezeptoren. Die Stäbchen (engl.: rod) selbst werden in ein äußeres Segment (ROS: engl. Rod Outer Segment) und ein inneres Segment unterteilt. Die ROS haben eine Länge von etwa

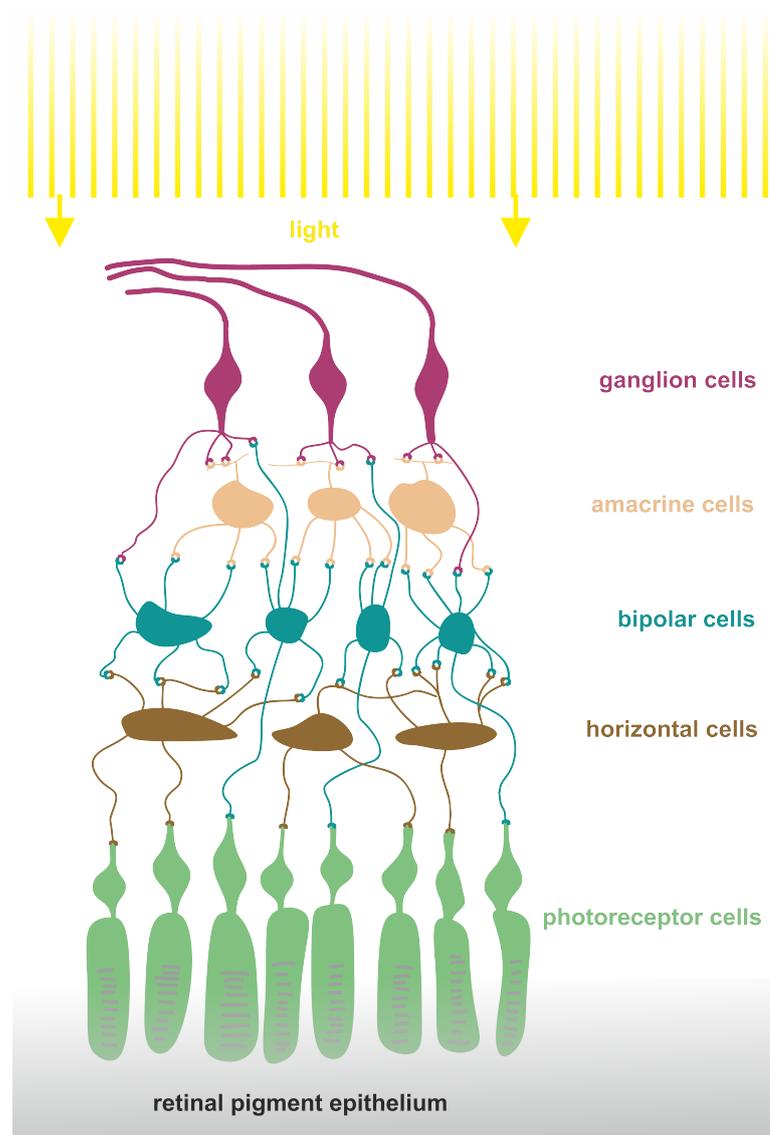


Abbildung 4.4: Schema zum Aufbau der Retina.

40  $\mu\text{m}$ . In ihnen befinden sich etwa 1000 Membranscheiben, die wiederum sehr dicht mit dem GPCR Rhodopsin besetzt sind. Das äußere Segment mit seinen Scheiben ist in Abbildung 4.4 mit grauen Strichen dargestellt. Das innere Segment sitzt darüber.

### 4.2.1 Signaltransduktion von Rhodopsin

Rhodopsin besteht aus Opsin und einer prosthetischen Gruppe. Diese ist das 11-*cis*-Retinal, welches kovalent am Protein gebunden ist. Dieser Chromophor absorbiert das einfallende Photon, was schließlich zur Aktivierung des Rezeptors führt. Der aktivierte Zustand des Rhodopsins wird als Metarhodopsin II (Meta II) bezeichnet. In diesem Photointermediat bindet das G-Protein Transducin an den Rezeptor[205]. Das Transducin ist ein heterotrimeres G-Protein, bestehend aus der  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheit.

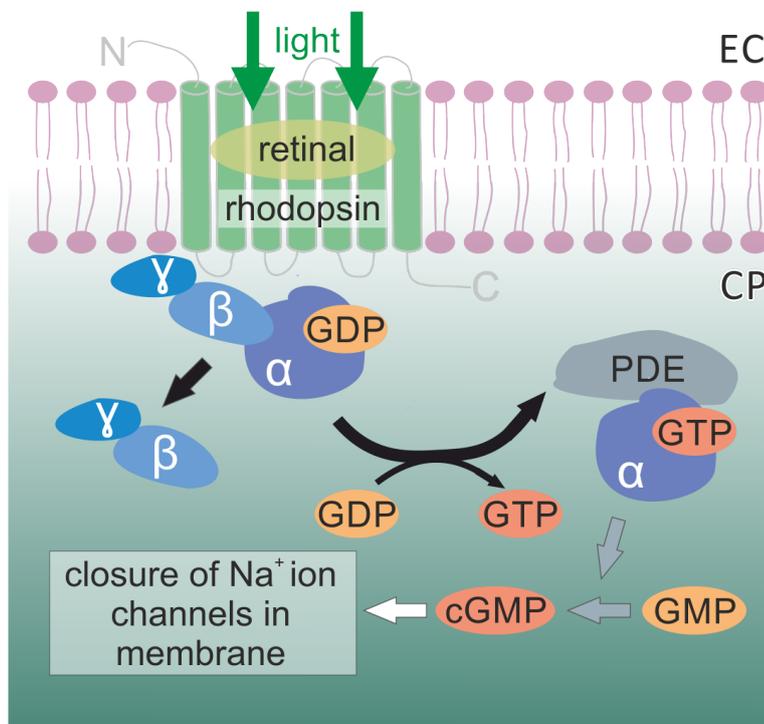


Abbildung 4.5: Signaltransduktion von Rhodopsin. Zur Erläuterung dieses Prozesses, siehe Text.

Analog zur Wechselwirkung mit Adenylatcyclase (siehe Abbildung 4.2), aktiviert nun die entkoppelte  $\alpha$ -Untereinheit mit dem GTP ein Enzym der Gruppe der Phosphodiesterasen (PDE)[207]. Das aktivierte PDE wiederum wandelt GMP in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) um. Dies hat wiederum zur Folge, dass cGMP-getriebene  $\text{Na}^+$ -Ionenkanäle schließen. Dieser Prozess ist in Abbildung 4.5 illustriert. Die Absorption eines Photons führt zur Bildung vieler cGMPs. Das Signal des Agonisten wird somit

in Form des sekundären Botenstoffes cGMP verstärkt.

Um die Sensorik visueller Wahrnehmung kontrollieren und adaptieren zu können, ist neben diesem Prozess der Aktivierung auch der Gegenprozess der Deaktivierung von zentraler Wichtigkeit[208]. Dazu wird die Bindungsfähigkeit von Rhodopsin im Meta II-Zustand mit Transducin drastisch reduziert. Dies wird über zwei Proteine reguliert, der GPCR-Rhodopsin-Kinase (GRK) und Arrestin[209].

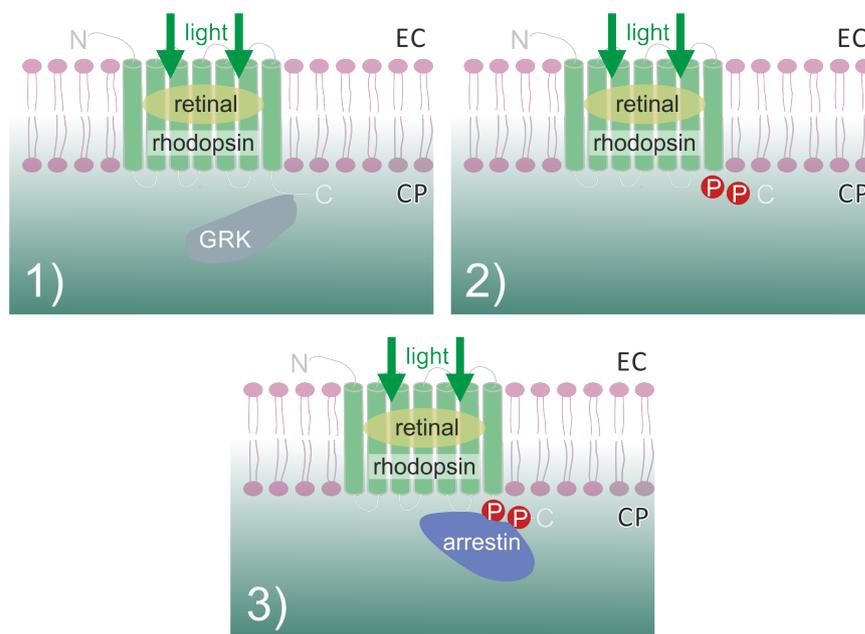


Abbildung 4.6: Deaktivierung der Signaltransduktion. GPCR-Rhodopsin-Kinase wechselwirkt mit Rhodopsin 1). Reste von Serinaminosäuren des C-Terminus werden phosphoryliert 2), was eine Bindung von Arrestin an den Rezeptor ermöglicht 3).

Im Meta II-Zustand konkurrieren GRK und Transducin um die Bindung an Rhodopsin. Die Konzentration von GRK ist allerdings wesentlich geringer als die von Transducin, weswegen die Aktivierung des G-Proteins den dominanten Prozess darstellt. Die Wechselwirkung von GRK mit Rhodopsin bewirkt eine Phosphorylierung an den Resten von Serinaminosäuren des C-Terminus[210]. Phosphoryliertes Rhodopsin hat eine hohe Affinität für Arrestin. Dessen Bindung an den Rezeptor verhindert schließlich die Wechselwirkung mit Transducin und unterbindet somit die Signaltransduktion (siehe Abbildung 4.6).

Dieser Prozess terminiert dahingehend, dass das Retinal als all-*trans*-Isomer aus dem Rhodopsin freigesetzt wird und das übrig bleibende Opsin vom Protein Phosphatase dephosphoryliert wird[211].

### 4.2.2 Struktur von Rhodopsin

Das Protein setzt sich aus 348 Aminosäuren zusammen und bildet eine Anordnung von sieben  $\alpha$ -Helices in der Membran. Die hohe Ähnlichkeit zu Bakteriorhodopsin lässt einige Analogieschlüsse in der Struktur zu[212, 213].

Das Absorptionsmaximum des gebundenen 11-*cis*-Retinals liegt bei etwa 500 nm (im ungebundenen Zustand absorbiert es im blauen Spektralbereich). Das Retinal ist kovalent über eine protonierte Schiff'sche Base (pSB) an K296 (Helix 7) gebunden[214, 215]. Der deprotonierte Rest von E113 fungiert als Gegenion der pSB und stabilisiert dadurch den Protonierungszustand der SB.[216].

Zwischen Cys-110 und Cys-187 (ECL2 und TM3) befindet sich eine Disulfidbrücke, die die Struktur des Grundzustandes stabilisiert[217–219]. Die Reste von Cys-322 und Cys-323 sind palmitoyliert und an der Membran gebunden. Diese befinden sich zwischen dem flexiblen C-Terminus[220, 221] und der  $\alpha$ -helikalen Struktur bei Position 306-314 vor dem zytoplasmatischen Ende von TM7[222].

In der Subfamilie Rhodopsin-ähnlicher GPCRs gibt es die hochkonservierte Gruppe des ERY-Motivs in Helix 3. Im Falle von bovinem Rhodopsin handelt es sich hierbei um die Sequenz E134-R135-Y136[223]. E134 bildet mit R135 eine Salzbrücke. Dieses wiederum wechselwirkt mit einem Threonin- oder Glutaminsäurerest von TM6. Diese Verbindung (ionischer Verschluss) löst sich nach Aktivierung des Rezeptors, woraufhin sich die beiden Helices voneinander wegbewegen können[200, 224]. Von E134 ist bekannt, dass dessen Protonierung zur Aktivierung des Rezeptors führt (Meta II-ähnlich)[225]. In Abbildung 4.7 ist das bovine Rhodopsin als Kristallstruktur illustriert.

Im aktiven Zustand sind mehrere Regionen an der Bindung des Transducins beteiligt. So spielen das hoch konservierte NPXXY-Motiv (NPIVY bei bovinem Rhodopsin) zwischen Helix 7 und 8[227], die Schleifen ICL2[228–230] und ICL3[231–233] als auch Helix 8 die zentralsten Rollen in diesem

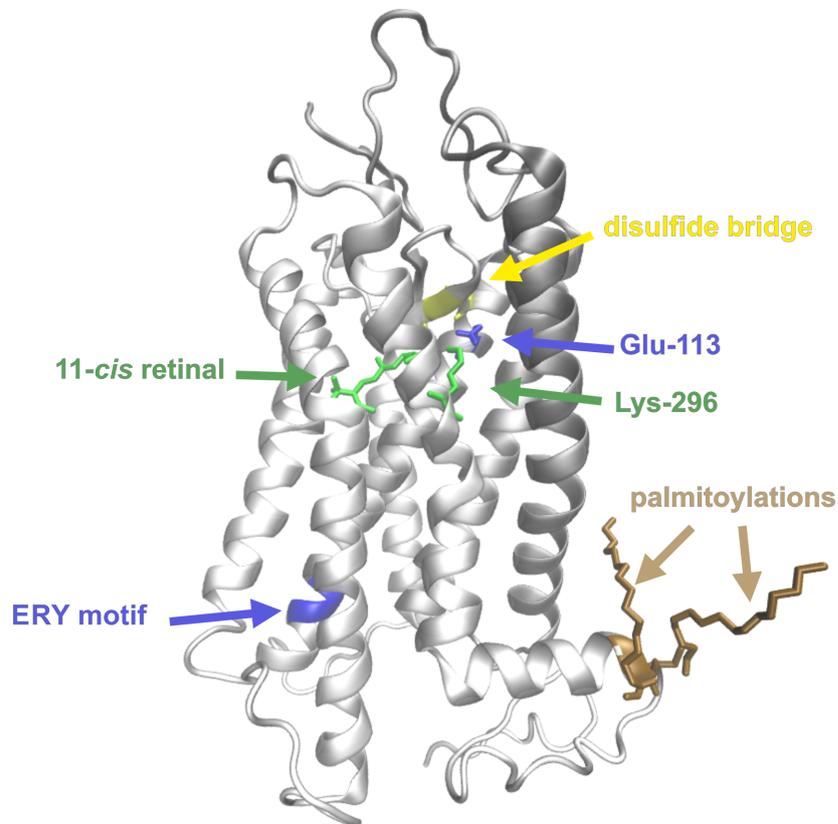


Abbildung 4.7: Die Struktur von Rhodopsin auf Basis der Kristallstruktur von Okada et al.[226] (PDB 1u19).

Prozess[234].

### 4.2.3 Photodynamik von Rhodopsin

Es stellte sich heraus, dass die Photoisomerisierung extrem schnell innerhalb von 50 fs erfolgt[235–239]. Hintergrund dieses sehr schnellen Prozesses ist die Wechselwirkung zwischen dem angeregten Retinal und dem Protein. Das Retinal ist nicht nur über die Schiff'sche Base am Lysin mit dem Protein verbunden. Die Schiff'sche Base ist außerdem über sein Gegenion (E113) stabilisiert[7, 240, 241]. Hinzu kommt, dass der  $\beta$ -Iononring an der hydrophoben Region des Rezeptors gekoppelt ist[242].

Rhodopsin ist ein hoch sensitives System. Dies ist erforderlich, da dieser Photorezeptor es erst ermöglicht, unter schwachen Lichtverhältnissen sehen zu können. Diese Eigenschaft erfordert eine extrem hohe Quantenausbeute

für die *cis*-*trans* Isomerisierung, die 0,67 beträgt[243]. Die Energie des Lichtes wird dabei über Verdrillungen und Konfigurationsänderungen im Retinal gespeichert[244, 245]. Dass diese hohe Effizienz durch die Kopplung zwischen Retinal und Protein erreicht wird, deutet bereits das Verhalten des Retinals in Lösung an: Die Isomerisierung des protonierten 11-*cis*-Retinals in Lösung liefert eine wesentlich geringere Quantenausbeute von etwa 0,15[246, 247]. Das primäre Photoprodukt von Rhodopsin, welches nach 50 fs bereits gebildet ist, heißt Photorhodopsin[235, 248, 249] und hat sein Absorptionsmaximum bei etwa 570 nm. In diesem Intermediat liegt das Retinal isomerisiert in einer verdrillten all-*trans*-Form vor[250–252]. Im angeregten Zustand findet eine extrem schnelle Deformationsbewegung der C11-C12-Doppelbindung statt[253–257]. Spektroskopische Untersuchungen im Infrarotbereich konnten zeigen, dass der primäre Schritt des Sehens eine vibronisch kohärente Bewegung mit sich bringt[258]. Das zweite Photoprodukt nach Photorhodopsin ist Bathorhodopsin, welches auf einer Pikosekundenskala akkumuliert[259–265]. Über Tieftemperaturmessungen im infraroten Bereich konnten beim Übergang zum Bathorhodopsin Änderungen von Wasserbanden im Bereich um  $3500\text{ cm}^{-1}$  festgestellt werden[266]. Es konnte gezeigt werden, dass eines dieser Wassermoleküle nahe bei E113, dem Gegenion, und damit nahe der SB sein muss[267]. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich primär der Bereich um die SB im Zuge der Isomerisierung bewegt und nicht der  $\beta$ -Iononring. Dieser bewegt sich erst später beim Übergang von Bathorhodopsin zu Lumirhodopsin[167]. In einer kristallographischen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass das Retinal im Bathorhodopsin mehr Richtung TM4 orientiert ist[254].

Zwischen diesem Übergang wird noch ein weiteres Photoprodukt bei 477 nm beobachtet, das BSI-Intermediat (BSI; engl.: Blue Shift Intermediate, deutsch: Blau verschobenes Intermediat). Das sich in Nanosekunden bildende Lumirhodopsin absorbiert bei 497 nm. In diesem Stadium ist das Retinal in der all-*trans*-Form relaxiert. Änderungen am Protein sind nur minimal bei TM3 und TM6 im Bereich des Chromophors beobachtet worden[265]. In Mikrosekunden zerfällt dieses Intermediat wiederum zum Metarhodopsin I (Meta I)-Intermediat, welches bei 475 nm absorbiert.

Ab Meta I ändert sich die Kinetik der Photodynamik erheblich. Meta I zeigt einen biphasigen Zerfall, der zur Bildung von Metarhodopsin II (Meta II)

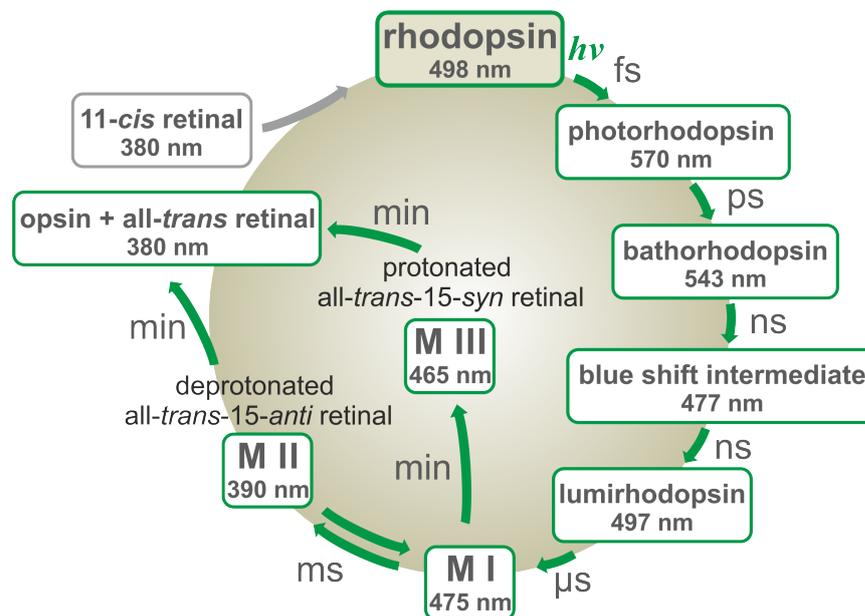


Abbildung 4.8: Illustration des Photozyklus von Rhodopsin.

und Metarhodopsin III (Meta III) führt[268, 269]. Zwischen Meta I und Meta II herrscht ein thermisches Gleichgewicht, das sich in Millisekunden einstellt. Meta II ist das aktive Intermediat von Rhodopsin[174, 205, 270]. In diesem Stadium kann Transducin aber auch andere wichtige Proteine wie Arrestin mit dem Rezeptor interagieren[173, 271]. Im Meta II-Zustand ist das Retinal gestreckter als in den vorangegangenen Intermediaten und hat eine *all-trans*-15-*anti* Konfiguration (siehe Abbildung 4.9). Außerdem ist die Schiff'sche Base deprotoniert, was zu der starken Änderung in der Absorptionscharakteristik zu etwa 390 nm führt[173]. In diesem Zuge wird das Gegenion E113 durch die Protonierung von der SB neutralisiert[272]. Die größte strukturelle Änderung ist eine nach außen gerichtete Verkippung von TM6 und eine Helixbewegung von TM5[202, 224]. Dies hat zur Folge, dass sich eine Spalte auf der zytoplasmatischen Seite bildet, die zur Wechselwirkung mit dem G-Protein erforderlich ist.

Der alternative Pfad (von Meta I ausgehend) führt zur Bildung von Meta III. Dieses Intermediat absorbiert bei 465 nm. Das Retinal liegt hier als *all-trans*-15-*syn* Isomer vor (siehe Abbildung 4.9), mit protonierter Schiff'scher Base[269, 273]. Meta III kann nicht mit Arrestin oder Transducin wechselwir-

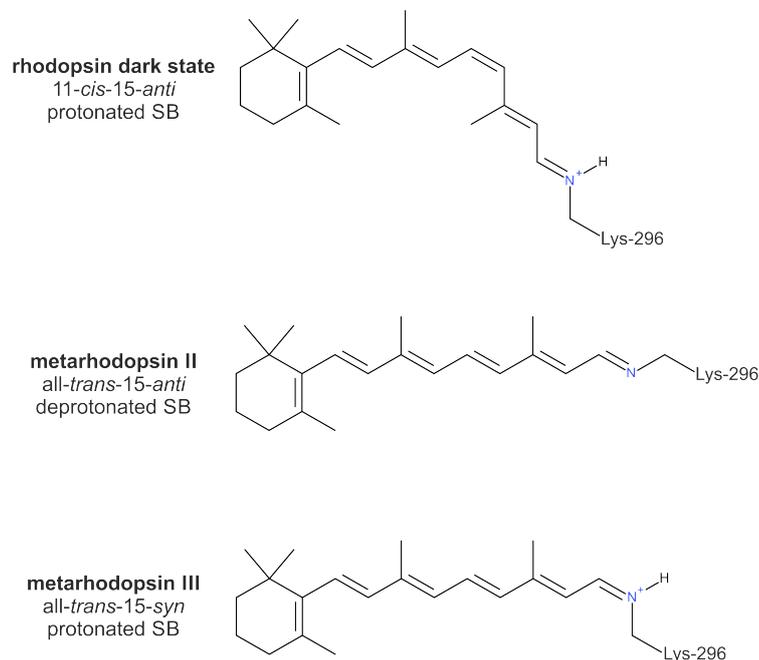


Abbildung 4.9: Konfigurationszustand des Retinals im Rhodopsin Grundzustand, Meta II und Meta III (von oben nach unten).

ken, weswegen es als inaktives Intermediat bezeichnet wird. Es wird vermutet, dass es physiologisch als ein Zustand zur Energiespeicherung dient[274]. So ist denkbar, dass Meta III eine regulatorische Rolle in der Lichtadaptation und in der Regenerierungsdynamik des Rezeptors spielt.

In einem letzten Schritt in der Zerfallsdynamik von photoaktiviertem Rhodopsin findet die Freisetzung des all-*trans*-Retinals[275] statt. Dieser Prozess resultiert sowohl aus dem Zerfall von Meta II als auch Meta III auf einer Minutenskala. Spektroskopisch äußert sich dieser Schritt in der Absorptionzunahme von freiem Retinal bei etwa 380 nm. Der in diesem Abschnitt beschriebene photoinduzierte Zerfall ist in Abbildung 4.8 schematisch dargestellt.

Der Zerfall über Meta III ist prinzipiell langsamer und nimmt einen Anteil von etwa 30% ein[276, 277]. Diese Verteilung ist jedoch stark abhängig von den physiologischen Bedingungen wie Temperatur und pH-Wert[278–280], aber auch von Arrestin, wie sich noch zeigen wird.

Um schließlich wieder in den Grundzustand zurückkehren zu können, wird das Opsin[281–283] gegebenenfalls dephosphoryliert und mit einem regenerierten 11-*cis*-Retinal in Wechselwirkung gebracht.

#### 4.2.4 Regenerierung des 11-*cis*-Retinals

Mit dem Zerfall von Meta II und Meta III wird der Chromophor vom Opsin über Hydrolyse gelöst und in der all-*trans*-Form im ROS der Photorezeptorzelle freigesetzt. Damit das Opsin wieder photosensitiv wird, muss ein 11-*cis*-Retinal an K296 kovalent binden. Folglich müssen die freigesetzten all-*trans*-Retinale in die 11-*cis*-Konfiguration zurückgeführt werden. Dieser Mechanismus funktioniert wie folgt:

Zunächst wird das von Rhodopsin freigesetzte all-*trans*-Retinal aus der Disk-Membran mit dem Adenosintriphosphat bindenden Kassetten-Transporter (ABC-Transporter) befördert[284]. Dort wird es mit der reduzierten Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) zum all-*trans*-Retinol reduziert. Diese Reaktion wird wiederum über das Enzym all-*trans*-Retinol Dehydrogenase (RDH) katalysiert[285, 286]. Im nächsten Schritt diffundiert das Retinol in das Retinal-Pigmentepithel (siehe auch Abbildung 4.4)[287–289]. Dort sorgt das Enzym Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) für die Konvertierung zum all-*trans* Retinylester[290]. Anschließend reagiert dieses mit Isomerhydrolase zum 11-*cis*-Retinol[291–293]. In einem letzten Schritt entsteht aus diesem mit 11-*cis*-Retinol Dehydrogenase (11-*cis* RDH) schließlich das 11-*cis*-Retinal[294]. Dieses diffundiert zurück zum Rezeptor[295, 296] und bindet kovalent an ein Opsin.

### 4.3 Arrestin

Eine fundamentale Rolle in der Regulation und Signaltransduktion von GPCRs spielt die Proteinfamilie der Arrestine[297]. Im Jahre 1986 wurde diese regulative Funktion im Sehprozess an bovinem Arrestin entdeckt[209]. Die Anzahl an Typen dieses Proteins variiert. So ist bei invertebraten Systemen bisher erst ein Typ bekannt, während bei Fischen bisher vier entdeckt wurden. Bei Säugetieren wird zwischen vier Typen unterschieden:

Arrestin-1[298, 299] und Arrestin-4[300] sind visuelle Arrestine, die in Stäbchen beziehungsweise in Zapfen-Photorezeptoren entdeckt wurden. Arrestin-2 und Arrestin-3[301, 302], die nicht-visuellen Arrestine, wurden bereits mit zahlreich verschiedenen GPCRs in Verbindung gebracht und weisen somit keine hohe Spezifität für einen Typ von GPCRs auf[303], wie es bei den vi-

suellen Arrestinen der Fall ist. Arrestin-2 und Arrestin-3 werden oft auch als  $\beta$ -Arrestin und  $\beta$ -Arrestin-2 bezeichnet. Grund ist, dass es erstmals in Wechselwirkung mit  $\beta_2$ -adrenergem Rezeptor[304] nachgewiesen werden konnte. In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von Arrestin-1 mit bovinem Rhodopsin untersucht. Aus diesem Grund soll im Folgenden der Name Arrestin für Arrestin-1 stehen.

#### 4.3.1 Visuelles Arrestin-1

Arrestin bindet an die zytoplasmatische Oberfläche von phosphoryliertem Rhodopsin[305, 306] und unterbindet dadurch seine Wechselwirkung mit Transducin. Dieser Prozess wird oft auch als Desensibilisierung bezeichnet. Voraussetzung für die Bindungsfähigkeit von Arrestin ist, dass Rhodopsin im phosphorylierten Zustand vorliegt[307].

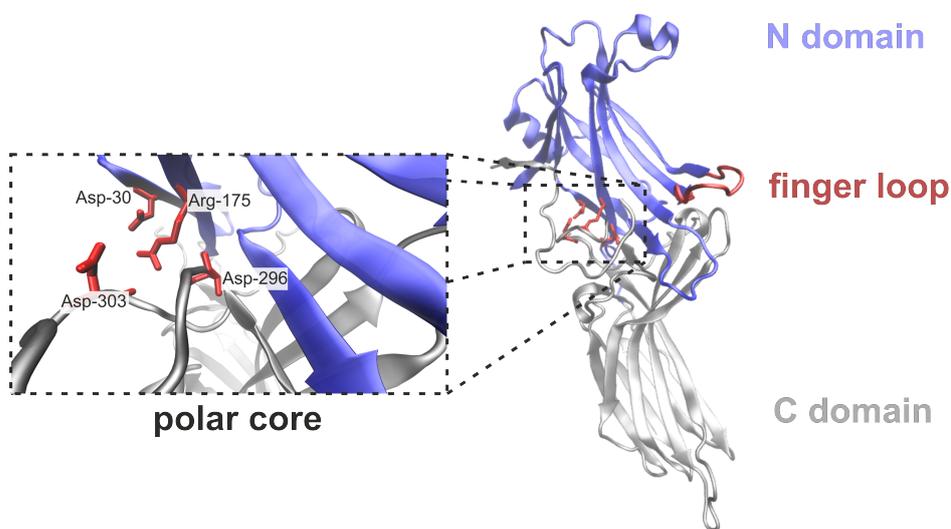


Abbildung 4.10: Kristallstruktur von Arrestin. Die rot markierten Aminosäuren stellen die wichtigsten Reste dar, die zusammen den polaren Kern bilden. Diese Struktur basiert auf [299] (PDB 1cf1).

Arrestin besteht aus zwei Domänen mit einer außergewöhnlich hohen strukturellen Homologie[299], die jeweils aus einem  $\beta$ -Sandwich mit sieben  $\beta$ -Faltblättern bestehen. Die Domänen werden als N- (Position 8-180) und

C- (Position 188-362) Domäne bezeichnet. Der C-Terminus des Proteins ist über einen flexiblen Linker mit der C-Domäne verbunden. Dieser Arm wechselwirkt an mehreren Stellen sowohl mit der N-Domäne als auch der C-Domäne und trägt dadurch zur Stabilisierung der Struktur bei. Zwischen den beiden Domänen befindet sich der sogenannte polare Kern, der in sich durch Wechselwirkung geladener Aminosäurereste stabilisiert ist. R175 (N-Domäne) tritt über jeweils eine Salzbrücke mit D30 (N-Terminus der N-Domäne) und D296 (C-Domäne) in Kontakt[308]. Außerdem weist diese Aminosäure eine Wasserstoffbrückenbindung mit D303 auf. Zusammen mit weiteren Wechselwirkungen mit den Aminosäuren R382 und K176[309], bilden diese zusammen den polaren Kern von Arrestin.

In diesem Zustand, in dem der polare Kern elektroneutral ist, kann Arrestin nicht an Rhodopsin binden. Dazu muss es erst aktiviert werden. Es wird angenommen, dass die Phosphatgruppe am C-Terminus des Rezeptors für diese Aktivierung verantwortlich ist: Der phosphorylierte C-Terminus an der zytoplasmatischen Seite beeinflusst die Elektrostatik des polaren Kerns von Arrestin. Die internen polaren Wechselwirkungen werden unterbrochen, was signifikante Konformationsänderungen zur Folge hat, die mit der Freisetzung des C-Terminus von Arrestin beginnt. Im aktiven Zustand geht es schließlich Wechselwirkungen mit dem Rezeptor ein und bindet an ihm. Somit erzeugt die Phosphorylierung Rhodopsins nicht eine Arrestin-spezifische Oberfläche[310, 311], sondern es wechselwirkt mit dem polaren Kern. Die Struktur von Arrestin ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

Eine weitere wichtige Gruppe von Arrestin für diesen Bindungsprozess ist die Schleife von G68 bis S78. Dieser Bereich wird als Fingerschleife bezeichnet. Während sie im inaktiven Konformationszustand noch sehr flexibel ist[31], sorgt dieser Bereich nach Aktivierung durch die Phosphatgruppe für die Stabilisierung der Konformation im aktivierten Zustand. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Fingerschleife zentral an der Bindung zu Rhodopsin involviert ist[312].

Im Jahre 2015 konnte erstmals eine Kristallstruktur von humanem Rhodopsin gebunden an eine präaktivierte Form von Arrestin gefunden werden[313]. Es konnte gezeigt werden, dass die Rhodopsin-Arrestin-Bindung im Wesentlichen aus vier verschiedenen Teilen besteht:

- 1) Die Fingerschleife wechselwirkt mit den Phosphatgruppen an TM7 und

TM8.

2) Arrestin formt eine Spalte, in die sich ICL2 setzt.

3) Das  $\beta$ -Faltblatt in der Nähe der Fingerschleife verknüpft sich mit TM5, TM6 und ICL3.

4) Das N-terminale  $\beta$ -Faltblatt tritt in Wechselwirkung mit dem C-terminalen Ende von Rhodopsin.

### 4.3.2 Die Arrestin-1-Variante p44

In sehr vielen Species gibt es neben dem Arrestin auch eine gekürzte Arrestin-Variante, das sogenannte p44[314, 315]. Diese hat die identische Aminosäuresequenz wie Arrestin, mit dem Unterschied dass die letzten 35 Aminosäuren fehlen und durch ein Alanin ersetzt sind. Dies hat zur Folge, dass das C-terminale Ende fehlt[316]. Das p44 ist ebenfalls am Desensibilisierungsprozess beteiligt und hat insofern physiologische Relevanz[316–318].

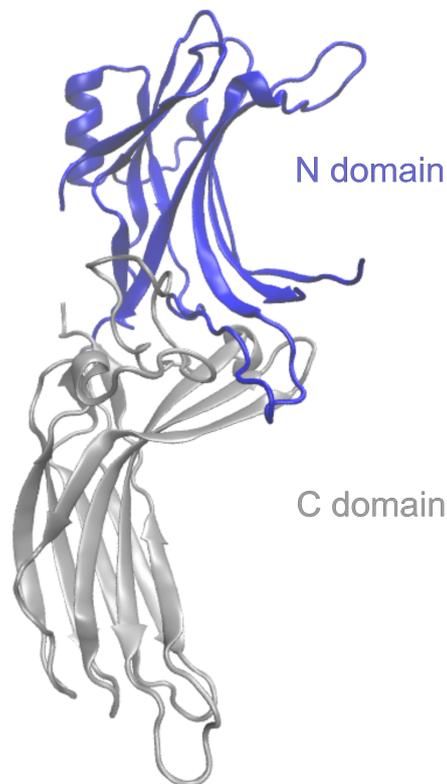


Abbildung 4.11: Kristallstruktur der Arrestin-1-Variante p44[318] (PDB 3ugu).

Die Elektrostatik des polaren Kerns dieses Proteins ist gestört, das R175 liegt frei und einige Schleifen zeigen vielmehr die strukturelle Charakteristik von aktiviertem Arrestin. Eine der größten Unterschiede (neben des polaren Kerns) macht sich in der veränderten Lage der Fingerschleife bemerkbar [319]. Dies hat zur Folge, dass p44 eine höhere Bindungsaffinität zu phosphoryliertem Rhodopsin hat als Arrestin. Erstaunlicherweise hat sich gezeigt, dass p44 - im Gegensatz zu Arrestin - außerdem die Fähigkeit hat, selbst an unphosphoryliertem Rhodopsin zu binden [316, 317, 320]. Somit ist der Phosphorylierungsschritt in der Deaktivierung der Signaltransduktion für p44 überflüssig. Eine Strukturdarstellung dieses Arrestin-Typs ist in Abbildung 4.11 gegeben.

Ein großer Unterschied zwischen dem p44 und Arrestin-1 ist physiologischer Natur: Während p44 in den ROS vorzufinden ist, befindet sich inaktives Arrestin hauptsächlich im Zytoplasma des inneren Segments der Stäbchen (siehe Abbildung 4.4) [321]. Es kann folglich nur zeitverzögert mit Rhodopsin in Wechselwirkung treten, da es vorher den Weg vom inneren zum äußeren Segment zu überbrücken hat [322].

#### 4.4 Einfluss des Arrestins auf den Photozerfall von Rhodopsin

Lichtadaptiertes Sehen erfordert eine Mischung von verschiedenen, parallel ablaufenden Prozessen. So muss stets je nach Lichtverhältnissen die Aktivierungs- [323] mit der Deaktivierungskinetik angepasst werden. Denn nur über die Deaktivierung von photaktivem Rhodopsin kann die hohe Photosensitivität der Photorezeptoren beibehalten werden [324]. Gleichzeitig müssen die Prozesse, die zur Regenerierung inaktiven Rhodopsins führen, dynamisch mit ins Gleichgewicht gebracht werden.

Die Homöostase von freiem all-*trans*-Retinal ist dabei besonders wichtig [325]. Wie oben bereits mehrfach erläutert, bildet sich dieses im Zuge des Photozerfalls von Rhodopsin im ROS. Retinal kann im Auge toxisch wirken, da es Epoxide über Oxidation bildet. Dies kann wiederum zu Dysfunktionen im Sehvermögen führen und bleibende Schäden verursachen, wie sie bei altersbedingter Makuladegeneration (AMD) zu beklagen sind [326–328].

Die wesentlichsten Prozesse, die die Konzentration an freiem Retinal be-

stimmen, sind zum einen die Freisetzungskinetik des Chromophors vom Opsin und zum anderen die Umwandlung von Retinal zu Retinol durch RDH[329, 330]. Der Grund, warum nun toxische Mengen an Retinal im ROS akkumulieren können, liegt an dem verhältnismäßig langsamen Prozess der enzymatischen Konvertierung zum Retinol[331, 332].

Es konnte in nativen Membranen gezeigt werden, dass bei der Hälfte der Population von phosphorylierten Opsinen mit daran gebundenem Arrestin der Agonist all-*trans*-Retinal bindet. Dies hat zur Folge, dass die Regenerierung von Rhodopsin gehemmt und die Konzentration von freien all-*trans*-Retinalen reduziert wird[333].

Eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit ist, inwiefern Arrestin die Retinalhomöostase und damit auch die Regenerierung von photosensitivem Rhodopsin durch Wechselwirkung mit aktiviertem Rhodopsin beeinflusst. Es wurde berichtet, dass Arrestin zur Stabilisierung des Meta II-Zustands führe, was eine zeitlich verzögerte Freisetzung des Retinals zur Folge hätte[334]. Die Rolle von Meta III war dabei aber noch nicht geklärt. Diese Frage konnte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schwalbe von der Goethe-Universität Frankfurt am Main beantwortet werden. Die Studie wurde 2015 in

Chatterjee/Eckert et al., **Influence of Arrestin on the Photodecay of Bovine Rhodopsin**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13555-13560

Chatterjee/Eckert et al., **Influence of Arrestin on the Photodecay of Bovine Rhodopsin**, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13759-13764

publiziert und wird im Folgenden vorgestellt[320, 335].

Die Probenpräparation von Rhodopsin und sämtliche NMR-Experimente wurden von Dr. Deep Chatterjee durchgeführt[336].

Experimente mit p44 bringen (wie weiter oben bereits erläutert) den Vorteil mit sich, dass auf den Phosphorylierungsschritt und somit auf die Zugabe von Kinase in die Probe verzichtet werden kann. Der Einfluss auf den Photozerfall des Rhodopsins durch Arrestin ist mit p44 somit direkter messbar. Darüberhinaus ist der Effekt von p44 auf die Meta III-Dynamik vor dieser Studie völlig unbekannt gewesen. Nachteil ist hingegen, dass p44 dazu neigt zu aggregieren. Dies ist nicht der Fall bei einer gekürzten, dem p44

sehr ähnlichen Arrestin-Variante Arr1-378. Aus diesen Gründen, wurden sämtliche Experimente mit dem mit p44 nahezu übereinstimmenden Arr1-378 durchgeführt[337]. Dieses soll im Folgenden Arr-Tr genannt werden.

Das nichtphosphorylierte Rhodopsin wurde in HEK293 Zellen exprimiert [338, 339] und mit 1,2-Diheptanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DHPC) in Wasser solubilisiert.

Im Jahre 2014 konnten Stehle et al. zeigen, dass fünf Tryptophanreste von Rhodopsin in NMR-Experimenten genutzt werden können, um Informationen über die Dynamik des Photozerfalls zu erhalten[268, 340, 341]. In der kinetischen Analyse erhielt man zwei verschiedene Zeitkonstanten (8 min und 34 min), die dem biphasigen Zerfall über Meta II beziehungsweise Meta III zugeschrieben wurde. In dieser Studie wurde Rhodopsin mit DDM solubilisiert. Für Experimente mit Arrestin ist dieses Detergens nicht geeignet, da Arrestin bei DDM destabilisiert[342]. Aus diesem Grunde wurde DHPC verwendet. Dies bringt wiederum den Nachteil mit sich, dass darin die Kinetik deutlich schneller abläuft als in DDM, was eine kinetische Untersuchung mit NMR-Methoden erheblich erschwert. Zwar konnte gezeigt werden, dass die in DDM gefundene Zuordnung der Tryptophansignale auch in DHPC gelingt und dass die Faltung des Proteins in den beiden Detergenzien sehr ähnlich ist. Außerdem konnte festgestellt werden, dass prinzipiell ein biphasiger Zerfall über Meta II und Meta III stattfinden muss. Um jedoch den Einfluss Arrestins auf diese Photodynamik untersuchen zu können, war diese zeitaufgelöste NMR-Methodik unzureichend. Im Grundzustand allerdings konnte eine wichtige Erkenntnis über das Verhalten von Arr-Tr in Anwesenheit von Rhodopsin gezogen werden. So zeigte sich, dass bereits im Grundzustand das Arr-Tr eine Bindung mit Rhodopsin eingeht, die keine signifikanten Strukturänderungen der transmembranen Struktur mit sich führt. Vielmehr scheint es am Bereich des C-terminalen Endes von Rhodopsin zu binden, da beobachtet wurde, dass die Flexibilität des C-Terminus bei Zugabe von Arr-Tr verloren geht[343, 344].

Um die Rolle von Arrestin in der Rhodopsin Kinetik zu entschlüsseln, wurden Blitzlichtphotolyseexperimente durchgeführt, die im Folgenden vorgestellt werden.

Für die optischen, zeitaufgelösten Messungen wurde der in Kapitel 'Experimentelles' beschriebene Aufbau verwendet. Die Proben (25  $\mu$ M bovines

Rhodopsin solubilisiert mit DHPC; pH-Wert 7,5[320]) wurden bei 500 nm angeregt und bis zu einer Verzögerungszeit von 10 min in 20 s Intervallen detektiert. Die zentrale experimentelle Herausforderung in der Untersuchung dieses Systems, ist dessen - im Gegensatz zu mikrobiellen Rhodopsinen - nicht-repetitive Photodynamik. Ein Aliquot lässt sich nur einmalig messen, da nach der Photoanregung das Retinal freigesetzt wird und sich kein inaktives Rhodopsin regenerieren kann. Aus diesem Grund ist bei diesen Experimenten besonderes Augenmerk auf ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis gelegt worden. Die Blitzlichtphotolysemessungen liefern eine spektrale Auflösung von etwa 0,5 nm. Die Daten wurden dynamisch entlang der spektralen Achse gemittelt. Dies erhöht das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf Kosten einer erniedrigten spektralen Auflösung von etwa 10 nm.

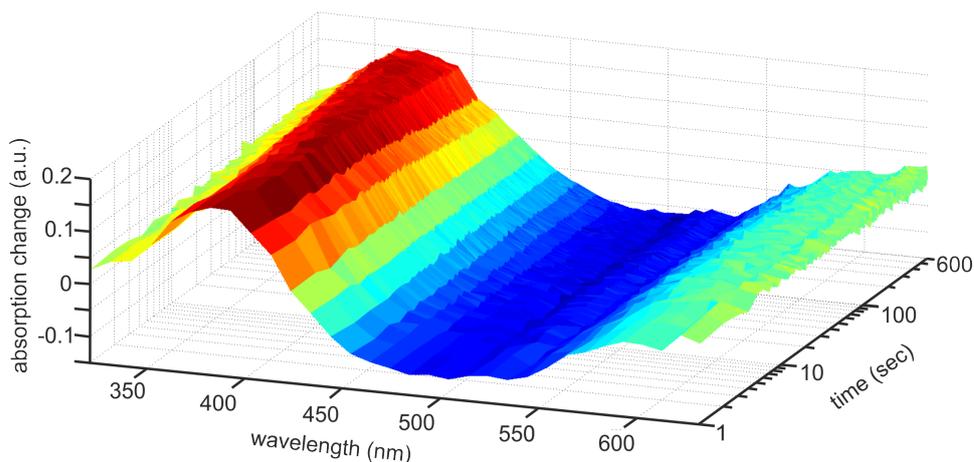


Abbildung 4.12: Transiente Absorption von Rhodopsin solubilisiert in DHPC bei Anregung mit einem 500 nm-Lichtpuls.

Mit dieser Messweise lässt sich die Dynamik des Meta II/III-Zerfalls detektieren. In Abbildung 4.12 ist die transiente Absorptionsmessung von Rhodopsin dargestellt. Der negative blaue Bereich resultiert aus dem Bleichen der Rhodopsin-Absorptionsbande um 500 nm. Bei etwa 400 nm zeigt sich eine schmalbandigere, positive Absorption. Da das freie Retinal und das Meta II-Intermediat beide in diesem Bereich ihr Absorptionsmaximum aufweisen, bilden deren Beiträge gemeinsam diese Bande. Der Zerfall von Meta II lässt

sich hier bereits durch den Zerfall des bathochromen Flügels bei etwa 410 nm verfolgen.

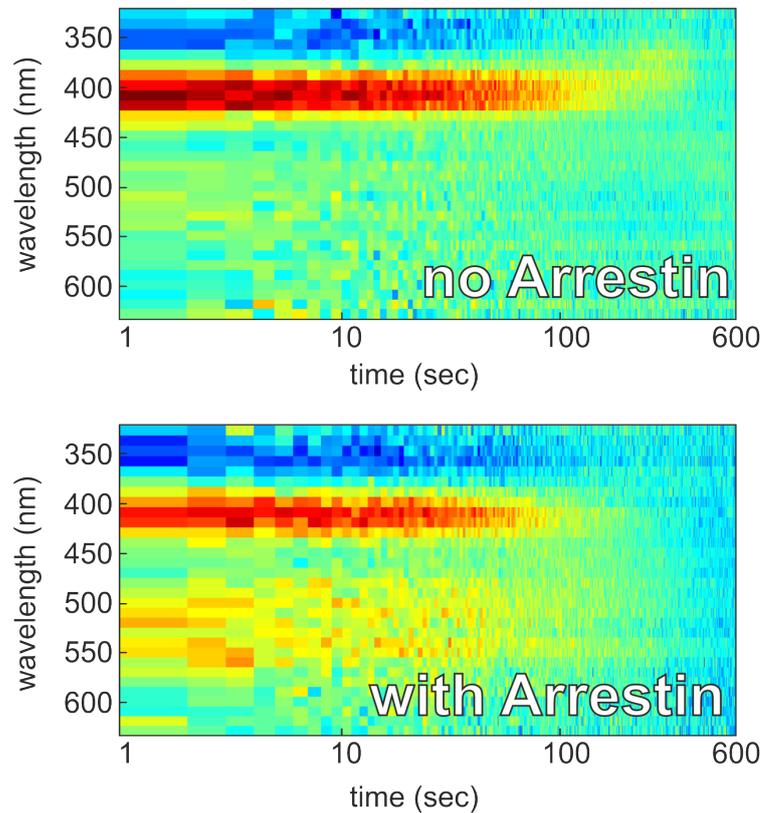


Abbildung 4.13: Transientes Doppeldifferenzspektrum von Rhodopsin solubilisiert in DHPC. Vom transienten Datensatz wurde hierzu die Absorptionsänderung bei der spätesten Verzögerungszeit (10 min) abgezogen. Oben: Messung mit 25  $\mu\text{M}$  Rhodopsin und 0  $\mu\text{M}$  Arr-Tr; unten: Messung mit 25  $\mu\text{M}$  Rhodopsin und 100  $\mu\text{M}$  Arr-Tr.

Die zu Grunde liegende Photodynamik bleibt in dieser Darstellungsform allerdings weitestgehend verborgen. Aus diesem Grund ist in Abbildung 4.13 oben die gleiche Messung als Doppeldifferenzspektrum dargestellt. Das heißt, dass die Absorptionsänderung bei der spätesten Verzögerungszeit (10 min) vom gesamten transienten Datensatz abgezogen wurde. Es zeigt sich nun deutlicher die abfallende Absorptionsbande von Meta II. Dessen Maximum liegt bei etwa 410 nm. Die spektrale Verschiebung kommt daher zu Stande, dass die negative Bande bei etwa 350 nm mit ihr überlagert. Diese wiederum resultiert aus der Absorptionscharakteristik des freien Retinals,

welche im Doppeldifferenzspektrum zu frühen Verzögerungszeiten negativ sein muss.

Das untere 2D-Doppeldifferenzspektrum von Abbildung 4.13 bezieht sich auf die Photodynamik von Rhodopsin in Anwesenheit von Arr-Tr bei einem Konzentrationsverhältnis von 4:1 (Arr-Tr : Rhodopsin). Ein Vergleich dieser beiden Spektren macht deutlich, dass Arr-Tr dazu führt, dass eine weitere positive Bande im Bereich von 460-560 nm im Photozerfall auftritt. Diese Absorptionsbande beschreibt den Beitrag von Meta III.

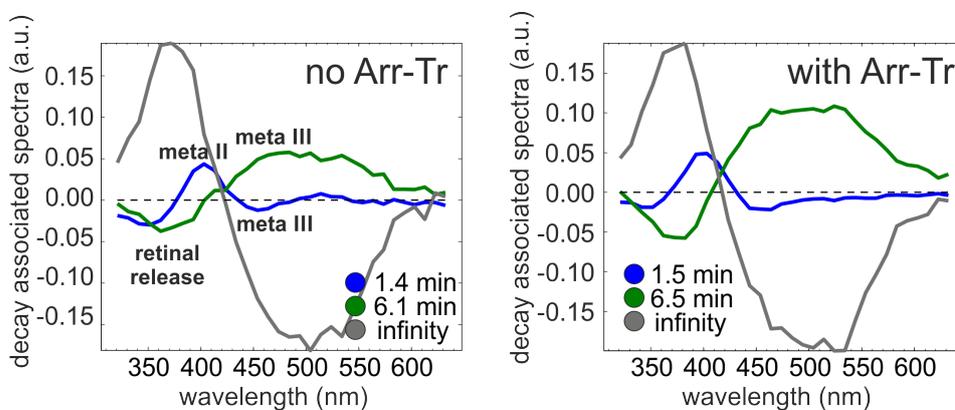


Abbildung 4.14: Zerfallsassoziierte Spektren zu den transienten Messungen mit 25  $\mu\text{M}$  Rhodopsin und 0  $\mu\text{M}$  Arr-Tr (links) beziehungsweise 25  $\mu\text{M}$  Rhodopsin und 100  $\mu\text{M}$  Arr-Tr (rechts).

Für eine quantitative Auswertung wurden die Daten über eine GLA-Routine analysiert[40, 121]. Diese Analyse lieferte eine Zerfallskinetik, die mit zwei Zeitkonstanten und einer unendlichen Zeit beschrieben wird. Die zerfallsassoziierten Spektren ohne beziehungsweise mit 100  $\mu\text{M}$  Arr-Tr sind in Abbildung 4.14 gegeben. In grau ist jeweils das Spektrum zur unendlichen Zeit dargestellt, welches um 500 nm das Bleichen des Grundzustands beschreibt (negativer Beitrag) und bei etwa 380 nm die Akkumulation freien Retinals (positiver Beitrag). Das DAS für 1,4 min (blau) hat sein Maximum bei etwa 400 nm und zwei lokale Minima bei 460 nm und bei 360 nm. Dies deutet darauf hin, dass die Zeitkonstante von 1,4 beziehungsweise 1,5 min mehrere Prozesse beschreibt: Der Zerfall von Meta II bei 400 nm, die daraus resultierende Bildung freien Retinals (360 nm) und die Bildung des Meta III-Intermediats (465 nm). Das DAS-Spektrum zur Lebensdauer 6,1 min

(grün) beziehungsweise 6,5 min ist durch ein Minimum bei etwa 360 nm und einem breiten Spektralbereich positiver Absorption zwischen 440 und 600 nm charakterisiert. Die negativen Banden werden jeweils der Bildung von freiem Retinal zugeordnet, welches aus dem Zerfall von Meta III resultiert (positiver Bereich in den zerfallsassoziierten Spektren). Auffällig ist, dass der positive Bereich der grünen Kurve bei Anwesenheit von Arr-Tr wesentlich ausgeprägter ist, was auf eine höhere Meta III-Beteiligung am Photozerfall hindeutet.

Es ist nicht auszuschließen, dass hier mehrere, kinetisch getrennte Prozesse in der GLA-Analyse in einem DAS-Spektrum zusammengefasst werden. Außerdem sind in der Photodynamik gestreckt-exponentielle Prozesse denkbar, die in der GLA-Analyse unberücksichtigt bleiben würden. Aus diesen Gründen wurden die transienten Absorptionsmessungen einer modellunabhängigen LDA-Analyse unterzogen. Diese ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Von links nach rechts ist die LDM zur Rhodopsinphotodynamik bei einer Arr-Tr-Konzentration von 0, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  gezeigt.

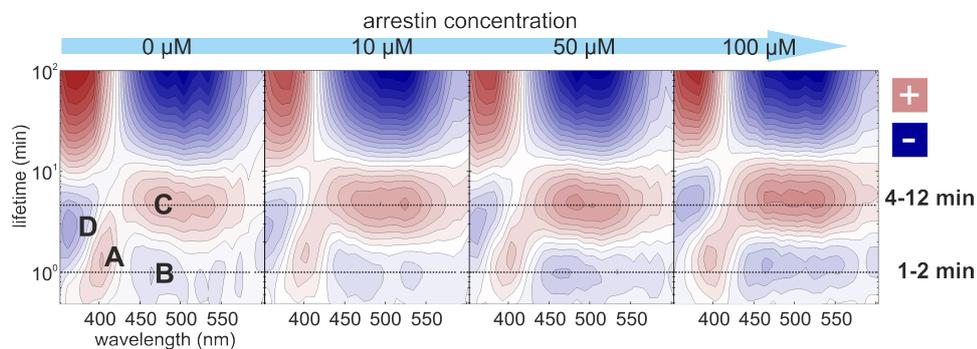


Abbildung 4.15: Lebensdauerdichteanalyse der transienten Absorptionsmessungen. LDMs von 25  $\mu\text{M}$  Rhodopsin mit zunehmender Konzentration von Arr-Tr (von links nach rechts: 0, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  Arr-Tr-Konzentration).

In einer LDM beschreibt ein positiver Bereich (rot) Absorptionszerfall und negative Amplituden (blau) stehen für eine Zunahme in der Absorption, wohingegen weiß für keine Änderung steht. In den LDMs finden sich im Wesentlichen vier signifikante Distributionen, die mit den Buchstaben A bis D in der ersten LDM markiert sind. Die zwei stärksten Signaturen im Bereich sehr hoher Lebensdauern spielen in der Beschreibung der Photodynamik keine Rolle, da diese sehr langlebige, konstant bleibende Komponenten sind.

Diese Signaturen beschreiben - in Analogie zu den Spektren der unendlichen Zeitkonstante in den DAS - die Absorption des freien Retinals und die Bleichbande des Grundzustands.

Ähnlich zu den Ergebnissen aus der GLA-Analyse, zeigt sich in den LDA-Ergebnissen, dass der Zerfall von Meta II (Signatur A) kinetisch im gleichen zeitlichen Bereich liegt wie die Bildung von Meta III (Signatur B). Signatur C beschreibt vermutlich den späteren Zerfall von Meta III. Dass Signatur C breiter und homogener als Signatur B erscheint, hat folgenden Grund: Die Bildung von Meta III geht einher mit dem Zerfall von Meta I. Dessen Absorptionsmaximum liegt bei 475 nm und überlagert sich folglich mit Signatur B in Form einer rotverschobenen, positiven Verteilung. Die blaue Distribution (D) wird als Freisetzungskinetik des Retinals interpretiert. Dessen zeitliche Position in der LDM bei Abwesenheit von Arr-Tr lässt darauf schließen, dass die Bildung des freien Retinals aus zwei Pfaden, dem Zerfall von Meta II und Meta III, gleichermaßen resultiert. Kommt Arr-Tr hinzu, verzögert sich die Lebensdauer von Signatur D deutlich von 2,5 min zu 5,3 min. Ein Vergleich der vier LDMs in Abbildung 4.15 zeigt außerdem, dass die Amplituden, welche die Bildung (B) und den Zerfall (C) von Meta III charakterisieren, mit zunehmender Arr-Tr-Konzentration intensiver werden. In Tabelle 4.1 sind die spektralen Positionen der Amplituden, der zugehörigen Lebensdauern und der Amplitudenwerte der hier diskutierten Signaturen aufgelistet. Wie die Breiten dieser Signaturen entlang der y-Achse in Abbildung 4.15 bereits deutlich machen, sind die Fehler der Lebensdauern sehr groß (relativer Fehler von 40%). Insofern können die Werte von Tabelle 4.1 lediglich als grobe Anhaltspunkte zur Beschreibung der Signaturen herangezogen werden.

Tabelle 4.1: Auflistung der spektralen Positionen und Lebensdauerwerte der Amplituden von Signaturen A-D und der Amplitudenwerte in den LDMs von Rhodopsin (25  $\mu\text{M}$ ) bei einer Konzentration von 0, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  an Arr-Tr.

$\text{Arr}(\mu\text{M})$	$\tau(\text{min})$				Wellenlänge (nm)				Ampl. ( $10^{-3}$ )			
	0	10	50	100	0	10	50	100	0	10	50	100
A	1.3	1.6	1.5	1.5	400	400	400	390	3	3	4	4
B	1.2	1.0	1.1	1.3	465	465	465	465	-1	-2	-3	-4
C	5.0	5.0	5.5	5.3	500	525	480	500	3	6	7	7
D	2.5	2.7	2.7	5.3	365	355	365	375	-4	-3	-4	-4

Aus diesen Beobachtungen lässt sich Folgendes schließen: Die Wechselwirkung von Arr-Tr mit photoaktiviertem Rhodopsin (Meta II) bewirkt, dass sich der gesamte Photozerfall verzögert und die Retinalfreisetzung über Meta II gehemmt wird. Folglich verschiebt Arr-Tr das Meta II/Meta I-Gleichgewicht Richtung Meta I, was schließlich zu einer Akkumulation von Meta III führt. Dadurch verdoppelt sich die Zeitkonstante der Retinalfreisetzung, da der langsamere Meta III-Pfad nun im Gesamtzerfall von Rhodopsin wesentlich stärker beiträgt. Dies ist in Abbildung 4.16 illustriert (grüne Pfeile).

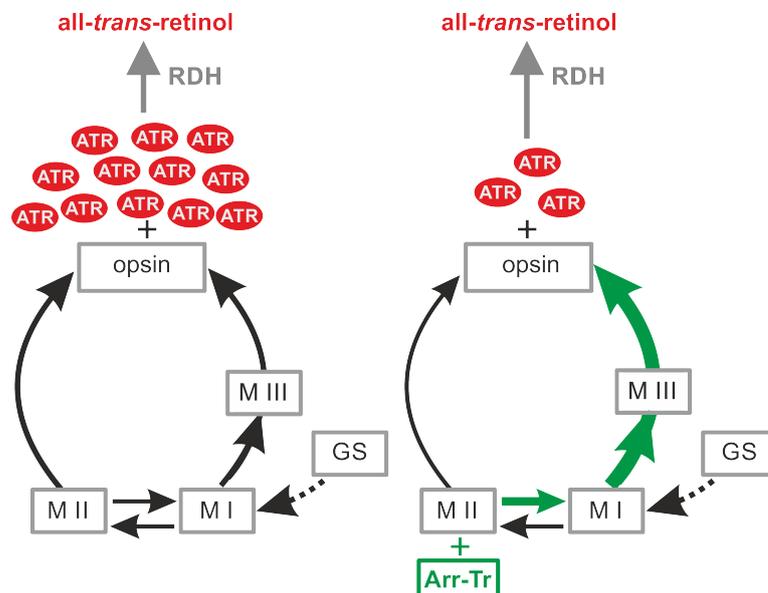


Abbildung 4.16: Modell zum Einfluss von Arr-Tr auf die Photodynamik von Rhodopsin.

Diese Ergebnisse legen eine wichtige Rolle von Arr-Tr und dem Intermediat Meta III in der Regulation der Konzentration freier *all-trans*-Retinale in den ROS nahe. Es zeigt sich nun, dass nicht nur der Zerfall von Meta II einen ratenlimitierenden Faktor in der Retinalregenerierung darstellt, sondern ebenso der Zerfall von Meta III einen zusätzlichen Faktor in der Homöostase freier *all-trans*-Retinale mit sich bringt. In der Vergangenheit wurde bereits vermutet, dass Meta III als ein Energie speicherndes Intermediat betrachtet werden könnte, welches bei erhöhten Lichtintensitäten dazu dient, die Freisetzung des Retinals zu verzögern[269]. Die hier vorgestellten Forschungsergebnisse sprechen für diese physiologische Interpretation von

Meta III. Entsprechend scheint p44 neben seiner zentralen Aufgabe, die Signaltransduktion zu stoppen, auch in der Regulation freier Retinale in den Photorezeptoren von Bedeutung zu sein.

## 4.5 Detergensabhängige Photodynamik von Rhodopsin

Die Untersuchungen der Rhodopsin-Photodynamikänderungen durch Arrestin basierten auf einer Probenpräparation mit dem Detergens DHPC. Wie bereits erwähnt, konnte für diese Studie DDM nicht verwendet werden, da Arrestin bei diesem Detergens destabilisiert wird[342].

Um den Einfluss des Detergens auf die photoinduzierte Zerfallsdynamik zu untersuchen, wurden Blitzlichtphotolyseexperimente in DDM durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

Die transiente Absorptionsmessung von Rhodopsin in DDM ist in Abbildung 4.17 gegeben. Es wurde in 0,5 min-Schritten bis zu einer Verzögerungszeit von 120 min gemessen.

Analog zu den Messungen in DHPC, zeigt sich eine durchgehend positive Bande bei etwa 390 nm und eine Bleichbande um 500 nm. Bei 390 nm lässt sich außerdem eine abfallende Dynamik bis etwa 10 min beobachten, die auch bei etwa 500 nm in Form von zunehmender Absorptionsänderung zu finden ist. Zu späteren Verzögerungszeiten (ab einigen zehn Minuten) fällt die Absorption in der Bleichbande weiter ab.

Für eine tiefergehende Analyse wurde diese Messung sowohl über eine GLA- als auch eine LDA-Routine analysiert. Die DAS-Spektren beziehungsweise die LDM sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

Die GLA-Analyse zu dieser Messung liefert eine kinetische Beschreibung mit drei Zeitkonstanten und einer unendlichen Zeitkonstanten. Die DAS (linke Seite in Abbildung 4.18) der beiden schnelleren Zeiten von 0,5 und 6 min weisen eine zueinander gespiegelte spektrale Symmetrie auf. In dem DAS-Spektrum für 0,5 min (6 min) wird ein negativer (positiver) Bereich um 400 nm deutlich, während sich um etwa 480 nm ein(e) Absorptions-

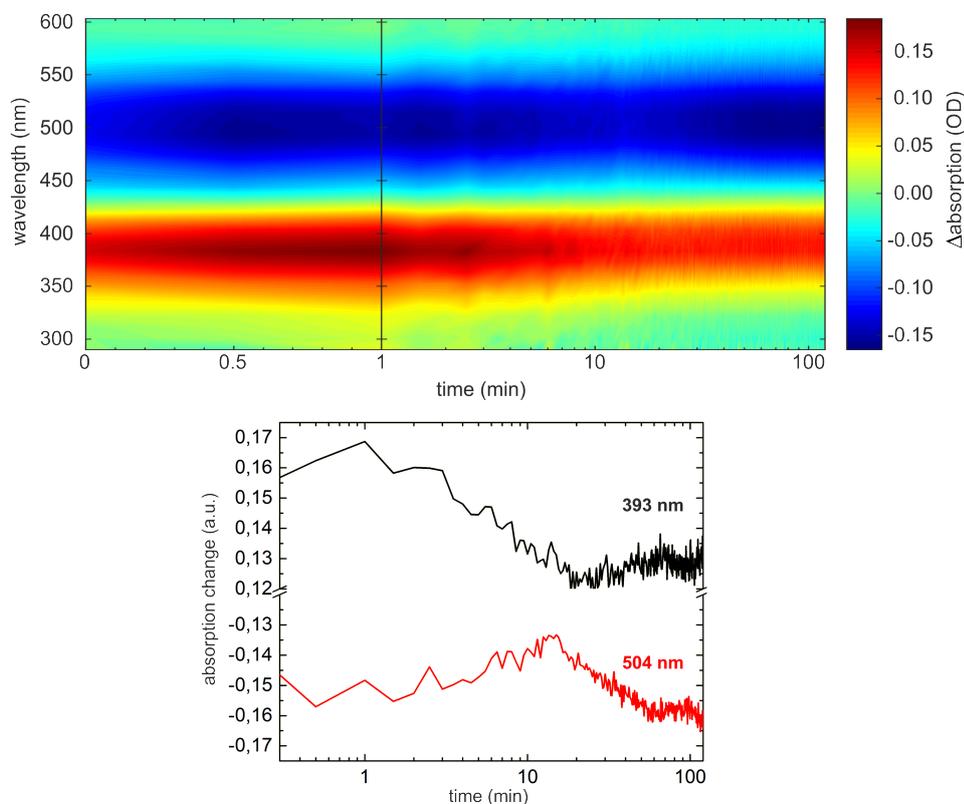


Abbildung 4.17: Transiente Absorption von Rhodopsin solubilisiert in DDM bei Anregung mit einem 500 nm-Lichtpuls.

zerfall (-zunahme) zeigt. Das DAS-Spektrum bezüglich der dritten 20 min-Zeitkonstante verhält sich wiederum entsprechend umgekehrt. Ein Analogieschluss zu den Messungen in DHPC legt die Vermutung nahe, dass die 6 und 20 min-Zeit den Zerfall von Meta II und die Bildung von Meta III beziehungsweise den Zerfall von Meta III und die Freisetzung vom all-*trans*-Retinal beschreiben. Die schnelle 0,5 min-Zeitkonstante kann womöglich als Zeitkonstante der Bildung des Intermediats Meta II interpretiert werden. Die LDA-Analyse liefert ein sehr ähnliches kinetisches Bild (siehe rechte Seite von Abbildung 4.18). Der Bereich um 6-7 min und um 40-60 min weist eine hohe spektrale Ähnlichkeit zu den DAS bezüglich der Zeitkonstanten 6 min beziehungsweise 20 min auf. Eine Kinetik zu frühen Zeiten, wie sie mit der 0,5 min-Zeitkonstante aus der GLA-Analyse beobachtet wurde, ist allerdings nicht festzustellen. Dies liegt vermutlich daran, dass die Photodynamik bei einer für diesen Zeitbereich unzureichenden zeitlichen Auflösung

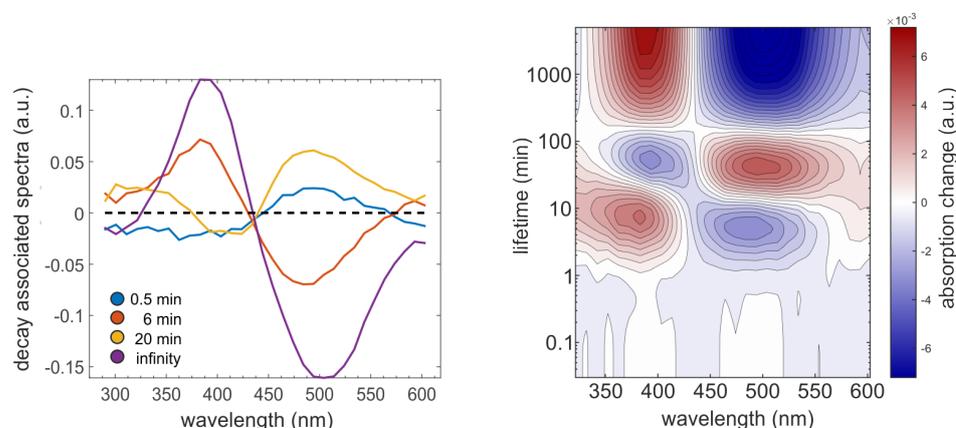


Abbildung 4.18: Links: Zerfallsassoziierte Spektren resultierend aus der GLA-Analyse der transienten Absorption von Rhodopsin solubilisiert in DDM. Rechts: Lebensdauerdichtekarte resultierend aus der LDA-Analyse der selben Messung.

(0,5 min) detektiert wurde, um eine verlässliche Analyse zu ermöglichen. Insofern ist aus der hier diskutierten Messung keine Aussage über die Kinetik in diesem Zeitbereich möglich.

Ein Vergleich der LDM mit der von Rhodopsin in DHPC macht zwei detergensabhängige Unterschiede deutlich: Zum einen ist der Photozerfall in DDM um einen Faktor von etwa vier langsamer als in DHPC. Zum anderen ist die Signatur, die die Retinalfreisetzung beschreibt, relativ zu den anderen Signaturen zu späteren Zeiten verschoben und gleicht sich kinetisch dem Zerfall von Meta III an. Diese Beobachtung wird als Änderung des Meta II/Meta III-Gleichgewichts interpretiert. Solubilisiert in DDM scheint die Bildung freien Retinals stärker vom Meta III-Pfad dominiert zu sein. Dass die Wahl zwischen DDM und DHPC als Detergens größere Auswirkungen auf die Photodynamik nach sich zieht, ist von Proteorhodopsin bekannt[116]. Die Ursache für die veränderte Zerfallsdynamik von Rhodopsin solubilisiert in DDM ist unklar. Eine Vermutung ist, dass DHPC und DDM aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen (der hydrophobe Teil von DDM ist wesentlich länger als der von DHPC) auch verschieden große Mizellen bilden. Dies beeinflusst den oligomeren Zustand von Rhodopsin und somit potentiell auch interprotomere Wechselwirkungen. Außerdem erfährt das Rhodopsin aufgrund unterschiedlicher Krümmungsradien der Detergensstruktur am Protein auch unterschiedliche Scherkräfte, die das Protein möglicherweise de-

formieren oder zumindest Konformationsänderungen beeinflussen[345, 346]. Außerdem können (Partial-)ladungen eines Detergens eine Rolle spielen. DDM weist keine elektronisch geladenen Gruppen auf, während DHPC eine Cholingruppe hat.

## 4.6 Nachtblindheit-assoziierte Mutante G90D

Mutationen in der Aminosäuresequenz von Rhodopsin führen zu Krankheiten wie kongenitale stationäre Nachtblindheit und Retinitis Pigmentosa (RP)[347–352].

Typische Symptome von RP sind Nachtblindheit, Störung in der Hell-Dunkel-Anpassung, Kontrastsehen, Tunnelblick (nur das zentrale Gesichtsfeld bleibt erhalten) und gestörtes farbliches Sehen. Im Verlauf dieser Erkrankung degradiert die Retina fortlaufend, Photorezeptoren sterben ab und im schlimmsten Fall endet RP in völliger Erblindung. Weltweit geht die Zahl der an RP Leidenden in die Millionen. Diese Erbkrankheit ist bis heute nicht heilbar.

Nachtblindheit - beeinträchtigt Sehvermögen bei schwachem Licht - wird oft auch als einziges Symptom beobachtet, ohne dass eine schleichende Degradierung der Retina zu erleiden wäre. In diesem Fall spricht man von der Erkrankung kongenitale stationäre Nachtblindheit (KSNB). Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erläutert wurde, hängt gutes Sehvermögen bei Dämmerlicht damit zusammen, dass der Photorezeptor Rhodopsin eine extrem kleine Rate für spontane Aktivierung aufweist: Die Lebensdauer des inaktiven Zustands beträgt 420 Jahre[353, 354]. Folglich ist der Rauschbeitrag entsprechend gering, was die Wahrnehmung von schwachem Licht erst ermöglicht.

Es wurde festgestellt, dass gewisse Mutationen von Rhodopsin dieses Grundrauschen erhöhen, indem sie eine erhöhte thermische Rate für die Aktivierung des Rezeptors bewirken. Oft wird in diesem Zusammenhang der Grundzustand einer Nachtblindheit-assoziierten Mutante auch als präaktiv bezeichnet[355]. Weitere Erklärungsansätze für Nachtblindheit sind konstitutive Aktivität[356] einer Opsin-Mutante oder eine durch Mutation bedingte reduzierte Menge an lichtaktivierbaren Rezeptoren[357].

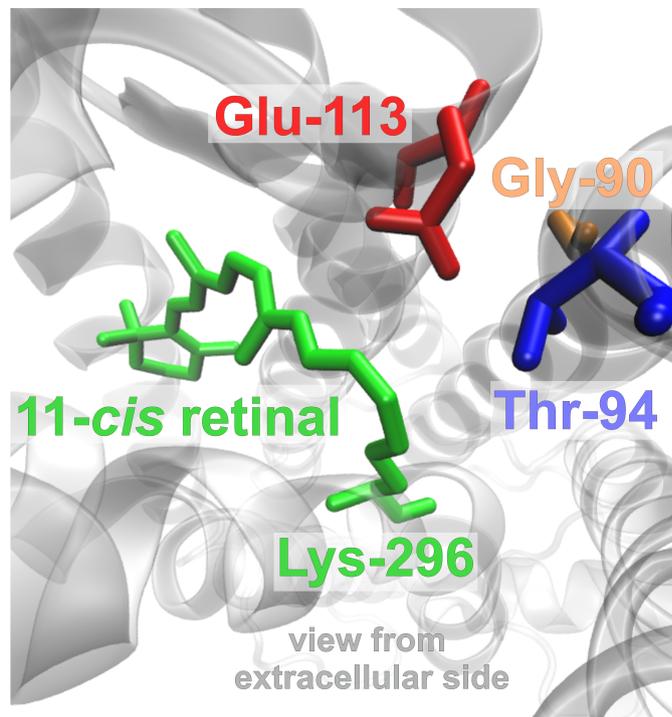


Abbildung 4.19: Strukturbild von Rhodopsin mit Blick von der extrazellulären Seite auf K296, E113 und zwei Positionen, an denen eine Mutation zu Retinitis Pigmentosa beziehungsweise zu kongenitaler Nachtblindheit führt (G90, T94). Die Kristallstruktur basiert auf der Arbeit von Okada et al.[226] (PDB 1u19).

Es ist bekannt, dass Mutationen am K296, der Rest an dem das Retinal am Opsin-Wildtyp kovalent gebunden ist, die Aktivierung von Transducin katalysieren, selbst bei Abwesenheit von Licht[358, 359]. Folglich sinkt die Lebensdauer des Photorezeptors im inaktiven Zustand erheblich beziehungsweise die Rate der thermischen Isomerisierung des Retinals nimmt zu, was sich im besonderen Maße durch beeinträchtigtes Sehvermögen bei schwachen Lichtverhältnissen bemerkbar macht.

Im Folgenden wird die Nachtblindheit-assoziierte Rhodopsinmutante G90D vorgestellt und ihre veränderte Photodynamik untersucht. Xie et al. konnten im Jahre 2003 zeigen, dass die Einführung einer Disulfidbrücke im extrazellulären Bereich die thermische Stabilität des Proteins erhöht[360]. Dazu wird D282 in der extrazellulären Domäne und N2 in ECL3 (siehe Abbildung 4.1) jeweils mit einem Cystein ersetzt, zwischen denen sich die Disulfidbrücke bildet. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass weniger als 50 % der Proteine mit der Doppelmutation nach einer Inkubationszeit

von 20 Tagen (und nach der Aufreinigung und Solubilisierung mit einem Detergens) destabilisierten, während die Ausbeute an Wildtyp-Opsin unter gleichen Bedingungen verschwindend gering war (pH 7,5; 20°C). Außerdem wurde berichtet, dass sich die Doppelmutante (N2C und D282C) generell leichter durch verschiedene Detergenzien solubilisieren lässt[361] als der Wildtyp. Die bessere Detergensverträglichkeit, die höhere thermische Stabilität und die höhere Ausbeute in der Herstellung begünstigen zahlreiche experimentelle Methodiken zur Untersuchung dieser Proben, wie beispielsweise in den Bereichen der NMR-Spektroskopie, optischen Spektroskopie oder Kristallstrukturanalyse[362]. Insofern kam die Idee auf, diese stabilisierte Doppelmutante zur Erforschung von Rhodopsin und von Rhodopsinmutanten heranzuziehen. Voraussetzung ist dabei, dass die N2C und D282C Mutationen möglichst geringe Auswirkungen auf die Photodynamik und die Struktur des Proteins haben. Standfuss et al. veröffentlichten die Kristallstruktur der Doppelmutante und berichteten von nur geringfügigen strukturellen Abweichungen vom Wildtyp[361]. Inwiefern sich die Kinetik des Photozerfalls allerdings ändert, war unklar. Es wurde behauptet, dass der Zerfall von Meta II durch die Doppelmutation nur geringfügig schneller ist (etwa 16 %)[360]. Allerdings wurde in dieser Studie die Kinetik der Retinalfreisetzung detektiert und als Zerfallskinetik des Intermediats Meta II interpretiert, ohne den Zerfall von Meta III zu berücksichtigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Photodynamik der Doppelmutante sowohl auf der Minutenskala als auch im ultraschnellen Zeitfenster untersucht. Die Doppelmutante soll im Folgenden vereinfachend als *stabilisiertes* Rhodopsin bezeichnet werden. Die Ergebnisse und der Vergleich zum Wildtyp wird im folgenden Unterkapitel erläutert. Anschließend werden die Ergebnisse aus den Messungen zur Photodynamik der Nachtblindheit-assoziierten Dreifach-Mutante G90D (und N2C, D282C) vorgestellt und mit dem stabilisierten Rhodopsin verglichen. Die Dreifach-Mutante wird im Folgenden als stabilisierte G90D-Mutante bezeichnet. Die Proben wurden von Nina Kubatova (AK Schwalbe, Goethe-Universität Frankfurt am Main) bereitgestellt und mit DDM solubilisiert. In Abbildung 4.19 sind G90 und T94 (T94I führt ebenfalls zu Nachtblindheit [363, 364]) mit E113 und dem 11-*cis*-Retinal am K296-Rest in einer Kristallstruktur des inaktiven Grundzustands graphisch hervorgehoben (mit Blick von der extrazellulären Seite).

### 4.6.1 Stabilisiertes Rhodopsin

Die Grundzustandsabsorption des stabilisierten Rhodopsins (Mutationen N2C und D282C) ist zusammen mit der des Wildtyps und der stabilisierten G90D-Mutante in Abbildung 4.20 gegeben. Die Absorption der Doppelmutante ist zu der des Wildtyps sehr ähnlich. Beide weisen lokale Maxima bei etwa 500 nm ( $S_0$ - $S_1$ -Übergang), 380 nm (Übergang zu höheren elektronischen Zuständen und Absorption von freiem Retinal) und 280 nm (Absorption des Proteins) auf.

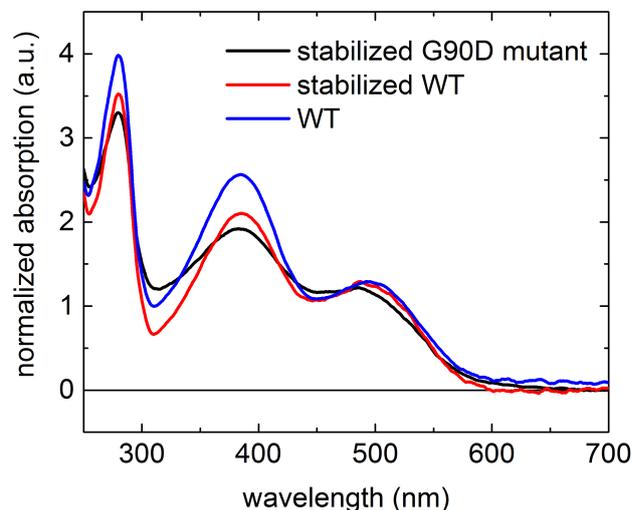


Abbildung 4.20: Normierte Absorptionsspektren des Rhodopsinwildtyps, des stabilisierten Rhodopsins und der stabilisierten G90D-Mutante (jeweils solubilisiert in DDM bei pH 6,5). Diese Messungen wurden von Nina Kubatova (AK Schwalbe, Goethe-Universität Frankfurt am Main) durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### Die Kinetik der Retinalfreisetzung

Die transiente Absorptionsänderung des stabilisierten Rhodopsins bis zu einer Verzögerungszeit von 120 min bei Anregung mit 500 nm-Licht ist in Abbildung 4.21 gegeben. Ähnlich wie im Verhalten vom Wildtyp (in DDM), zeigen sich zwei deutliche Signaturen bei etwa 400 nm und 500 nm. Bei 380 nm ist ein Absorptionszerfall bis etwa 10 min zu beobachten und zu

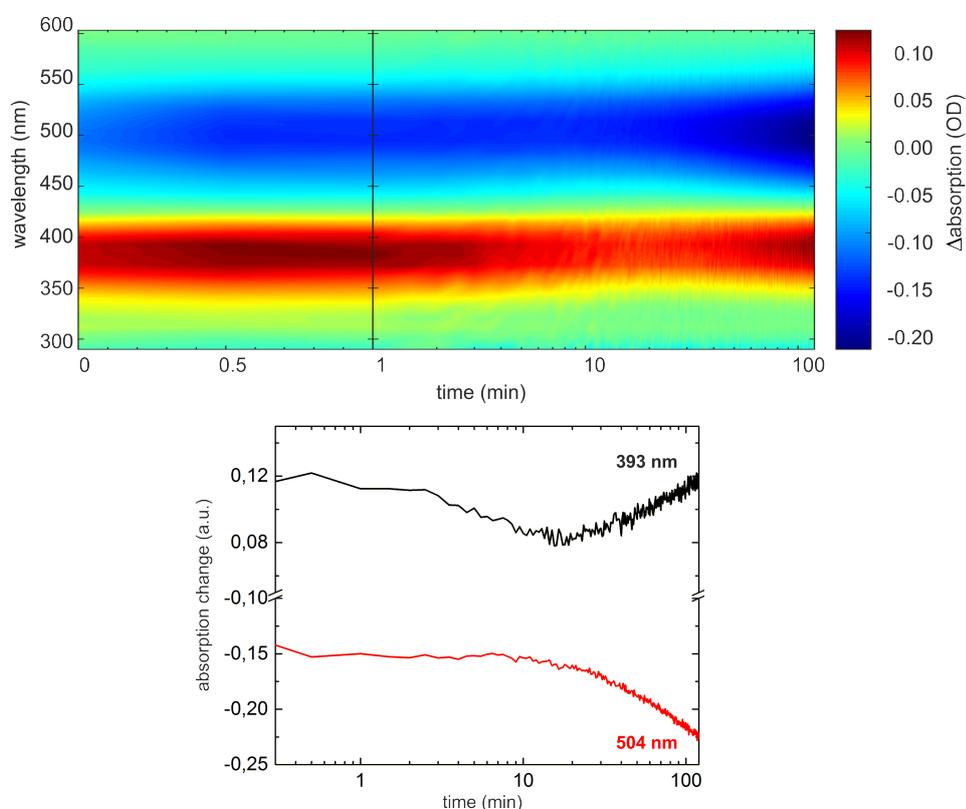


Abbildung 4.21: Transiente Absorption des stabilisierten Rhodopsins (N2C und D282C) solubilisiert in DDM (pH 6,5) bei Anregung mit einem 500 nm-Lichtpuls.

späteren Verzögerungszeiten eine Zunahme ab einigen zehn Minuten, die sich bei 500 nm in Form einer Absorptionsabnahme widerspiegelt.

Diese Messung wurde sowohl über GLA-Analyse als auch LDA-Analyse ausgewertet. Die daraus resultierenden DAS-Spektren beziehungsweise die LDM-Karte sind in Abbildung 4.22 dargestellt. Spektral zeigt sich in den zerfallsassoziierten Spektren und den Formen der Lebensdauerdichten hohe Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen vom Wildtyp (siehe Abbildung 4.18), was folgende Interpretation nahelegt: Der Zerfall von Meta II und die Bildung von Meta III erfolgen mit einer Zeitkonstante von etwa 8-10 min. Der Zerfall von Meta III und die Bildung freien Retinals erfolgt mit einer Lebensdauer von 80 min.

Das bedeutet, dass der Zerfall von Meta II von 6 zu 8-10 min leicht verlang-

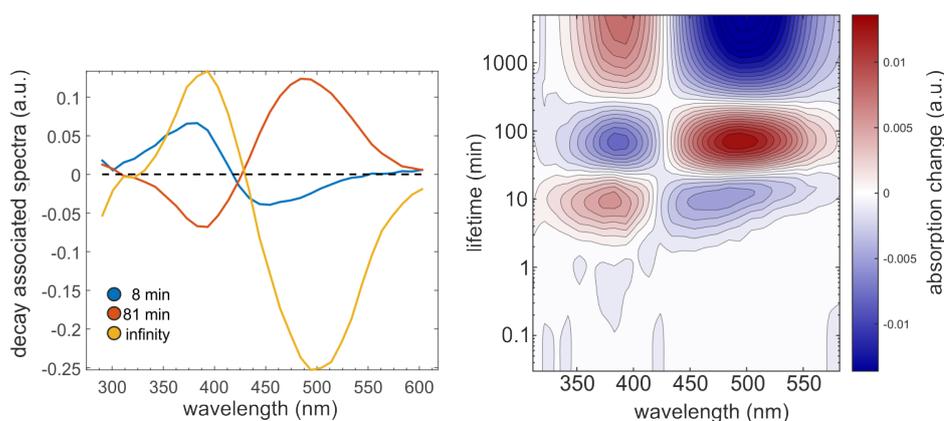


Abbildung 4.22: Links: Zerfallsassozierte Spektren resultierend aus der GLA-Analyse der transienten Absorption des stabilisierten Rhodopsins (Doppelmutante N2C und D282C) solubilisiert in DDM. Rechts: Lebensdauerdichtekarte resultierend aus der LDA-Analyse der selben Messung.

samt ist, während Meta III etwa vierfach langsamer zerfällt. Basierend auf diesen Daten führt die Doppelmutation und die Bildung der Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten folglich zu einer Stabilisierung der späten Photointermediate Meta III und von Meta II.

### Die frühe Photodynamik

Um zu untersuchen, inwiefern die frühe Photodynamik von der des Wildtyps abweicht, wurde eine ultraschnelle Absorptionsmessung sowohl vom Wildtyp als auch vom stabilisierten Rhodopsin durchgeführt. Aufgrund der nicht-repetitiven Dynamik und der sehr aufwändigen Probenpräparation von Rhodopsin, konnten jeweils nur transiente Datensätze aus 2-3 Mittelungen erfolgen. Folglich sind die Messungen verrauschter als die von Proteorhodopsin aber dennoch brauchbar für eine kinetische Analyse.

Im Folgenden wird zunächst die Ultrakurzzeitmessung vom Wildtyp vorgestellt und anschließend darauf aufbauend die vom stabilisierten Rhodopsin vergleichend diskutiert.

In Abbildung 4.23 ist eine 2D-Darstellung der frühen transienten Absorption vom Rhodopsin-Wildtyp solubilisiert in DDM nach optischer Anregung bei 500 nm mit einer Pulsenergie von 50 nJ gegeben.

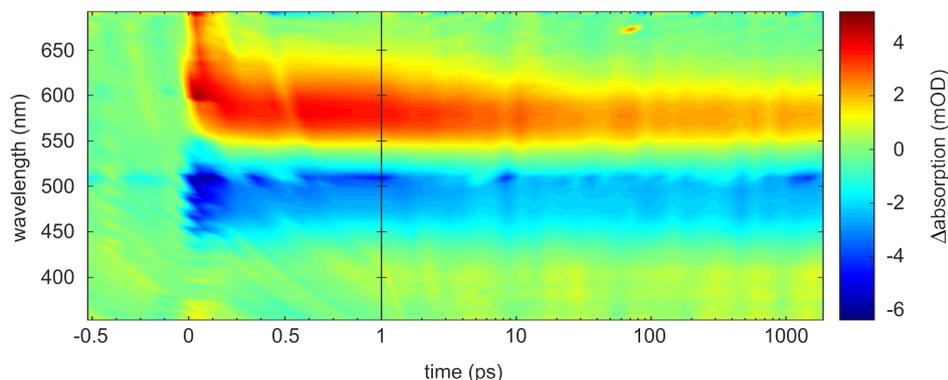


Abbildung 4.23: Ultraschnelle transiente Absorption von Rhodopsin (WT) solubilisiert in DDM (pH 6,5) bei Anregung mit einem 500 nm-Lichtpuls (50 nJ).

Zwischen 450 und 510 nm zeigt sich eine negative Bande, die aus dem Bleichen des Grundzustands resultiert. Zwischen 550 und 640 nm befindet sich eine positive Absorptionsbande, die sich bis zu einer Verzögerungszeit von etwa 20 ps verschmälert. Zwei Transienten bei 580 nm und 500 nm sind in blau beziehungsweise schwarz in Abbildung 4.24 (linke Seite) aufgetragen. Dieser Datensatz wurde mit der GLA-Routine gefittet (rote Kurven in Abbildung 4.24 links). Das Ergebnis ist eine Kinetik bestehend aus drei Zeitkonstanten (5 ps, 48 ps und 1,1 ns) und einer unendlichen Zeitkonstante. Die 5 ps-Zeitkonstante beschreibt einen Zerfall bei etwa 590 nm und eine Photoproduktbildung zwischen 460 und 540 nm.

Diese Beobachtung wird als Zerfall des Intermediats Photorhodopsin mit gleichzeitiger Bildung von Bathorhodopsin interpretiert (siehe auch Abbildung 4.8). Die beiden größeren Zeitkonstanten weisen in den DAS-Spektren eine fast identische spektrale Struktur auf. Beide DAS haben ihr Maximum im Bereich um 540 nm, was spektral mit dem Absorptionsmaximum von Bathorhodopsin übereinstimmt (siehe Abbildung 4.8). Somit lassen sich diese Kinetiken dem Zerfall dieses Intermediats zuordnen. Dieser Prozess ist allerdings noch nicht abgeschlossen, was die Präsenz einer deutlichen Absorptionsbande zentriert um 570 nm über 1 ns nach dem Anregungsereignis deutlich macht (siehe Abbildung 4.23 und grauer Verlauf in Abbildung 4.24). Die Bildung des primären Intermediats Photorhodopsin lässt sich im tran-

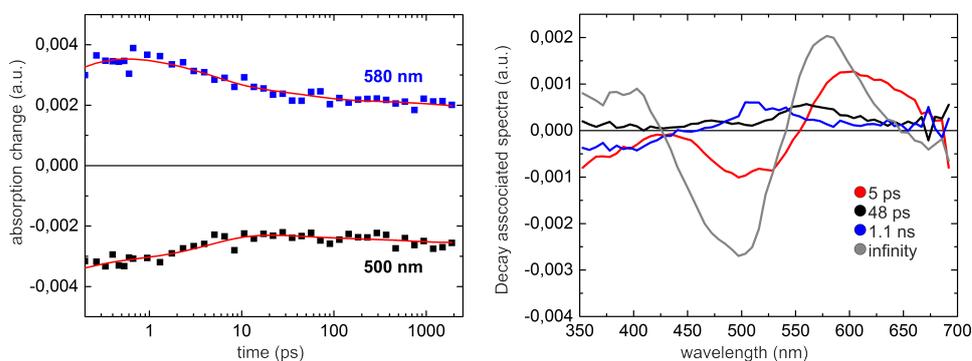


Abbildung 4.24: Links: Transiente Verläufe bei 580 und 500 nm von Rhodopsin (WT) in DDM mit Fit aus der GLA-Analyse (rot). Rechts: Zerfallsassozierte Spektren resultierend aus der GLA-Analyse der transienten Absorption von Rhodopsin (WT).

sienten Verlauf zwischen 0 und 0,2 ps vermutlich beobachten (Abbildung 4.23). Es gelang allerdings nicht die Kinetik dieses Prozesses zu fitten, was an der hierfür unzureichenden Zeitauflösung des Experiments liegt. Es ist bekannt, dass die Bildung von Photorhodopsin beim Übergang vom angeregten Zustand zurück zum Grundzustand über einen konischen Schnitt geschieht. Dieser Schritt ist bereits innerhalb von 50 fs abgeschlossen[237–239].

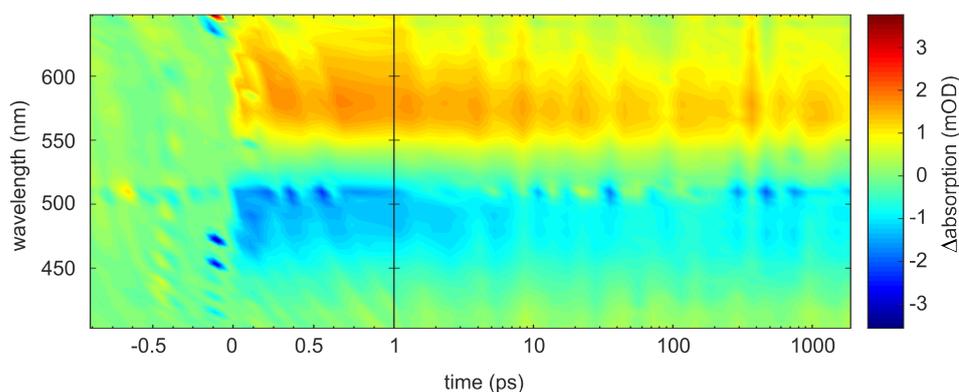


Abbildung 4.25: Ultraschnelle transiente Absorption des stabilisierten Rhodopsins (Mutationen N2C und D282C) solubilisiert in DDM (pH 6,5) bei Anregung mit einem 500 nm-Lichtpuls (50 nJ).

In Abbildung 4.25 ist die analoge transiente Messung zum stabilisierten Rhodopsin dargestellt. Da die Probenausbeute in der Herstellung dieser Rhodop-

sin Doppelmutante kleiner ausfiel als beim Wildtyp, konnte für dieses Experiment nur eine verhältnismäßig schwach konzentrierte Probe zur Verfügung gestellt werden. Nichtsdestotrotz zeigen sich deutliche Signaturen, die sich von denen in der Photodynamik des Wildtyps nicht wesentlich zu unterscheiden scheinen: Im Bereich um 480 nm findet sich wieder eine Bleichbande und zwischen 560 und 630 nm ist eine positive Absorptionsbande zu beobachten. Eine spektrale Verschmälerung nach einigen zehn Pikosekunden in diesem Bereich lässt sich wie beim Wildtyp auch für das stabilisierte Rhodopsin feststellen, die von einer entsprechenden Absorptionzunahme in der Bleichbande begleitet wird.

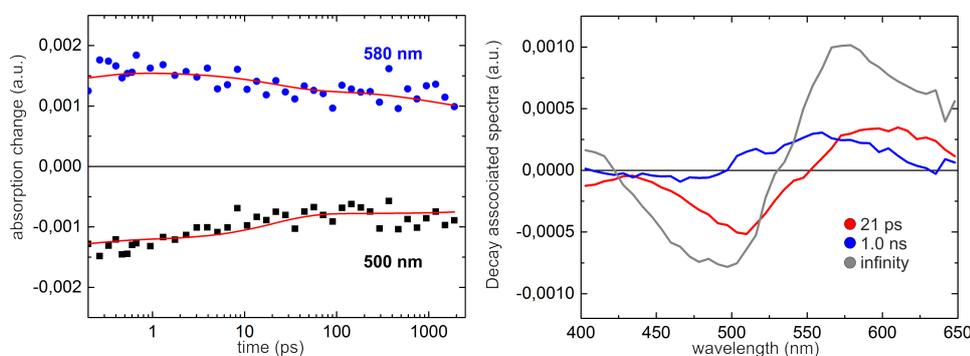


Abbildung 4.26: Links: Transiente Verläufe bei 580 und 500 nm des stabilisierten Rhodopsins (Doppelmutante N2C und D282C) in DDM mit Fit aus der GLA-Analyse (rot). Rechts: Zerfallsassozierte Spektren resultierend aus der GLA-Analyse der transienten Absorption des stabilisierten Rhodopsins.

Das GLA-Fitresultat dieser Messung ist in Abbildung 4.26 dargestellt. Links sind wieder zwei Transienten bei 580 nm und 500 nm mit den jeweiligen Fits (roter Verlauf) aufgetragen. Rechts sind die DAS zu den Zeitkonstanten 21 ps, 1,0 ns und einer unendlichen Komponente dargestellt. Die Hinzugabe einer weiteren Zeitkonstante in der Fitroutine resultierte stets in einer Kompensierung zweier Lebenszeiten. Das Wegnehmen einer Zeitkonstante führte wiederum zu einem schlechteren Fit, der nur unzureichend den Verlauf der Daten wiedergab. Aufgrund der spektralen Ähnlichkeiten dieser DAS-Spektren zu denen aus der Analyse des Wildtyps, ist die Interpretation analog zur Wildtypphotodynamik: Das Photorhodopsin zerfällt mit 21 ps zu Bathorhodopsin, welches sich (zumindest partiell) mit 1,0 ns abbaut. Diese Zeitkonstanten sollten allerdings aufgrund des verhältnismäßig schlechten

Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nur als Orientierung für die Größenordnung des jeweiligen kinetischen Prozesses verstanden werden. Aus dem gleichen Grund ist es möglich, dass die GLA-Analyse hier mehrere kinetische Prozesse teilweise nicht voneinander trennen kann und diese stattdessen als einen einzelnen kinetischen Prozess interpretiert. Je mehr sich nun die Zeitkonstanten solcher Kinetiken ähneln, desto stärker wird dieser parasitäre Effekt begünstigt. Dies könnte die spektrale Struktur des zerfallsassoziierten Spektrums zur Zeitkonstante 1.0 ns erklären: Die beiden lokalen Maxima bei etwa 515 nm und 560 nm sind auch in den zerfallsassoziierten Spektren aus der GLA-Analyse vom Rhodopsin-Wildtyp zu den Zeitkonstanten 1.1 ns beziehungsweise 48 ps (siehe Abbildung 4.24) zu beobachten. Insofern ist nicht auszuschließen, dass sich in dem 1,0 ns-Prozess der Photodynamik des stabilisierten Rhodopsins eine weitere Kinetik verbirgt.

#### 4.6.2 Die stabilisierte G90D-Mutante

Die Folgen einer G90D-Mutation wurden sowohl an Mäusen als auch an menschlichen Patienten untersucht[32, 355, 357, 365, 366]. Sie führt wie T94I zu einer konstitutiven Aktivierung des Photorezeptors im Grundzustand und damit zu einer Desensibilisierung visueller Wahrnehmung (Nachtblindheit) [33]. Interessanterweise ist die Position 90 die bisher einzig bekannte, an welcher verschiedene Mutationen entweder zu Nachtblindheit[367] oder zu Retinitis Pigmentosa[368] führen.

Im Jahre 2013 gelang es Singhal et al., eine Kristallstruktur der G90D-Mutante in einem Meta II-ähnlichen Intermediat zu bestimmen[369] (die Bildung einer Kristallstruktur von G90D im Dunkelzustand gelang bisher nicht). Dies wurde durch die Komplexbildung des Proteins mit dem Peptid G $\alpha$ CT2 ermöglicht. Dieses Peptid besteht aus 11 Aminosäuren und stellt ein Fragment des C-terminalen Teils der  $\alpha$ -Untereinheit vom G-Protein Transducin dar. G $\alpha$ CT2 bindet an aktivem Rhodopsin[174, 176]. Aus diesem Grunde wurde gefolgert (und konnte durch einen Vergleich mit der Kristallstruktur vom Rhodopsin-Wildtyp im Intermediat Meta II gezeigt werden), dass die untersuchte Kristallstruktur von G90D eine Meta II-ähnliche Konformation hat. Es wurde festgestellt, dass die Mutante in dieser Meta II-ähnlichen Konformation mehrere Isomere (13-*cis*, all-*trans*, 9,13-*di-cis*) nicht-kovalent in der Retinalbindetasche binden kann. Es wird vermutet,

dass der Grund für diese Beobachtung die kurze Distanz vom D90-Rest zum E113-Rest (3,6 Å) ist. E113 spielt eine zentrale Rolle in der Bindung des Retinals, da es als Gegenion zur Schiff'schen Base sowohl in der Stabilisierung als auch in der Hydrolyse des Chromophors involviert ist[370]. Das E113 bildet im Wildtyp eine Salzbrücke zur protonierten Schiff'schen Base und stabilisiert die inaktive Konformation des Photorezeptors. Diese Salzbrücke zerbricht im Zuge der photoinduzierten Isomerisierung und des Protonentransfers von der Schiff'schen Base zum E113[275]. Bei Abwesenheit vom Retinal bildet das Opsin eine stabilisierende Salzbrücke zwischen K296 - der Bindestelle des Retinals im Wildtyp - und dem E113[371]. Der Austausch von Glycin mit Asparaginsäure an Position 90 führt dazu, dass an dieser Stelle eine Carboxygruppe vorliegt. Diese kann mit der Wechselwirkung zwischen K296 und E113 interferieren und eine alternative Salzbrücke mit dem Lysin-Rest bilden. In Abwesenheit vom Retinal konkurrieren demnach E113 und D90 um eine Salzbrückenbindung mit dem Lysinrest. Dies könnte möglicherweise die wesentlich langsamere Aufnahmekinetik des 11-*cis*-Retinals vom G90D-Opsin erklären (verglichen mit Wildtyp-Opsin)[372]. Es konnte gezeigt werden, dass der E113-Rest vom G90D-Rhodopsin bereits im Dunkelzustand protoniert vorliegt[373, 374]. Der  $pK_S$ -Wert von E113 ist bei der Mutante folglich viel höher als im Wildtyp. Insofern stellt das E113 kein stabilisierendes Gegenion für eine Schiff'sche Base bereit. Stattdessen bildet D90 eine Salzbrücke mit dem Lysin-Rest, was eine kovalente Bindung mit dem Retinal instabiler werden lässt. Der Einfluss der Seitenkette von D90 auf die Absorptionscharakteristik des Dunkelzustands äußert sich in einer spektralen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Grundzustands zu etwa 485 nm (siehe auch Abbildung 4.20)[367, 373].

Der Grundzustand von G90D lässt sich als präaktiver Zustand beschreiben, weil erstens die Konformation der Helizes der des aktiven Meta II-Wildtypzustands ähnelt[371, 375], zweitens das E113 bereits im Dunkelzustand wie bei aktivem Rhodopsin protoniert vorliegt[373] und drittens die Wechselwirkung von D90 mit der Retinalbindestelle zu einer erhöhten thermischen Isomerisierungsrate führt[376, 377].

### Die Kinetik der Retinalfreisetzung

In einer zeitaufgelösten Untersuchung der Photodynamik von G90D (Zeitauflösung 1-2 min)[373] wurde ein Photoprodukt bei 468 nm beobachtet. FTIR-Messungen zeigten, dass die G90D-Mutante in diesem Zustand Ähnlichkeiten zu Meta II hat. Außerdem wurde beobachtet, dass dieses Photoprodukt wie Meta II Transducin aktivieren kann[367]. Der Zerfall der 468 nm-Species führt zur Freisetzung von Retinal. Über die Zerfallskinetik dieses Photoproduktes finden sich kontroverse Ergebnisse in der Literatur. So wird in [364] von einem etwa 12% langsameren Zerfall als beim Wildtyp berichtet. Dieses Messergebnis beruht auf einer transienten Absorptionsmessung bei 480 nm bei 25°C und pH 7,0. In einer anderen Studie[373] wird die Kinetik dieses Prozesses als 4-5 mal schneller angegeben als beim Wildtyp (bei 15°C und pH 8,0). Die Messmethodik war in dieser Veröffentlichung die gleiche wie bei [364]. Allerdings wurde für eine bessere Vergleichbarkeit innerhalb dieser Studie die Kinetik des Meta II-Zerfalls vom Wildtyp nicht untersucht. Stattdessen verglichen die Autoren ihre Ergebnisse zur Kinetik vom Meta II-ähnlichen Photoprodukt von G90D mit der Wildtypkinetik aus der Publikation von Sakmar et al.[216]. In allen drei Studien wird der Beitrag von Meta III oder einem Meta III-ähnlichen Intermediat nicht berücksichtigt.

Ein Jahr später (1997) wurden zeitaufgelöste Absorptionsänderungen im Bereich von einigen zehn Nanosekunden bis etwa 500 ms bei 10°C publiziert [378]. In dieser Studie wird vermutet, dass sich das Meta II-ähnliche Intermediat bei 468 nm aus einem Photoprodukt bildet, welches spektral dem Lumirhodopsin ähnelt. Es wird angenommen, dass dessen Akkumulation wiederum aus dem Zerfall von einem Gleichgewicht zwischen einem dem BSI (Blue Shift Intermediate) und einem dem Bathorhodopsin ähnlichen Intermediat resultieren könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die transiente Absorption von G90D solubilisiert in DDM analog zu den Experimenten am Wildtyp und am stabilisierten Rhodopsin (siehe Abbildungen 4.17 und 4.21) gemessen. Die Blitzlichtphotolysemessung ist in Abbildung 4.27 dargestellt.

Bei 380 nm lässt sich vermutlich die Akkumulation freier Retinale (ab etwa 30 min) beobachten, während die Bleichbande um etwa 500 nm abfällt. Zu

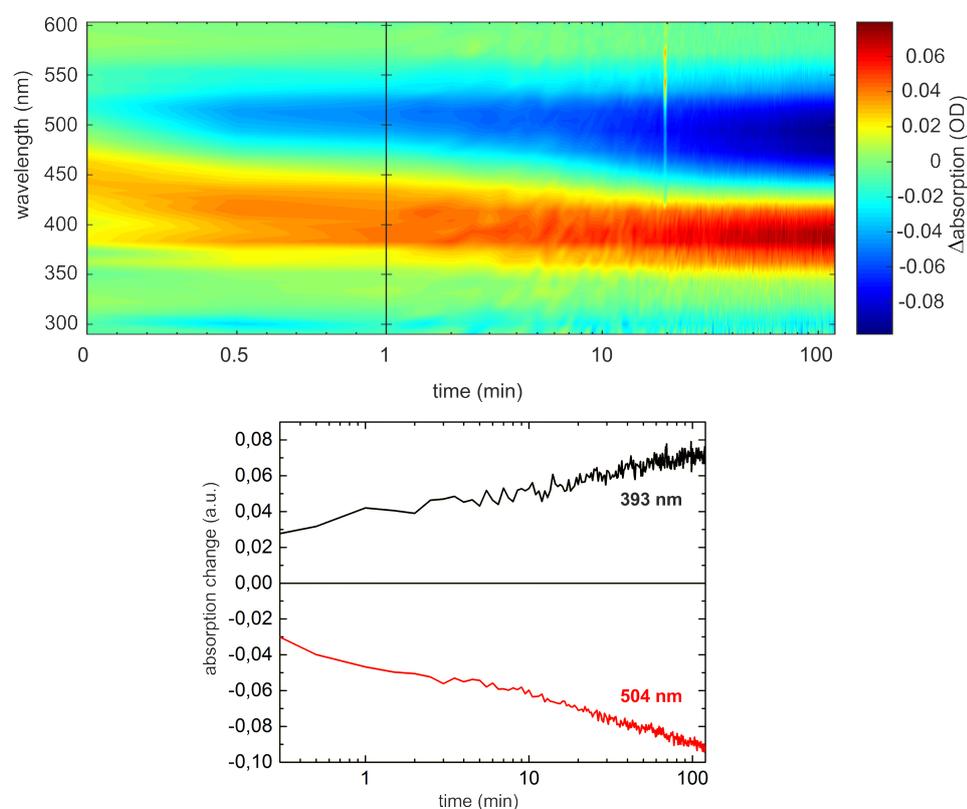


Abbildung 4.27: Transiente Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C, D282C) solubilisiert in DDM (pH 6,5) bei Anregung mit einem 490 nm-Lichtpuls.

frühen Verzögerungszeiten zeigt sich eine spektrale Blauverschiebung der positiven Absorptionsbande im Zeitbereich von 0 bis 1 min. Eine GLA-Analyse dieses Datensatzes liefert eine Kinetik bestehend aus drei Zeitkonstanten und einer unendlichen Komponente. Die dazugehörigen DAS-Spektren sind in Abbildung 4.28 links aufgetragen.

Die schnellste Zeitkonstante von 0,4 min beschreibt einen Absorptionszerfall um etwa 480 nm und eine leichte Absorptionszunahme zentriert bei 380 nm. Die DAS zu den beiden anderen Lebensdauern (10 und 56 min) haben eine ähnliche spektrale Struktur, mit den Unterschieden, dass das Maximum der 10 min-Kinetik bei etwa 460 nm liegt und das der 56 min-Zeit bei etwa 480 nm und dass das zerfallsassoziierte Spektrum der 56 min-Zeit eine spektral breitere Signatur aufweist.

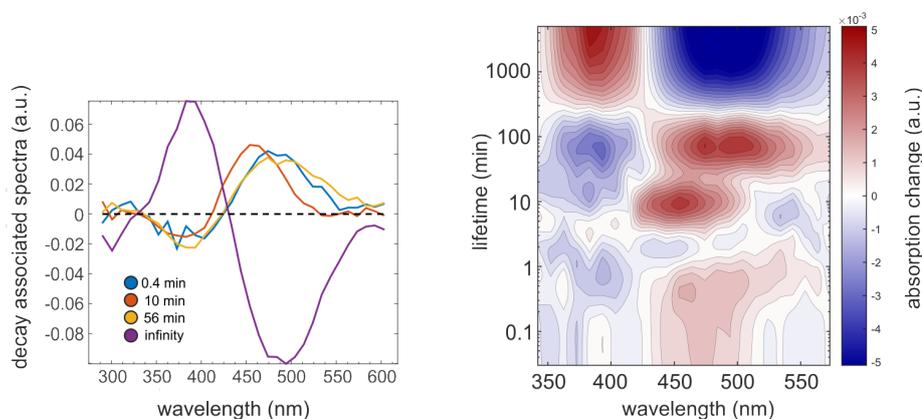


Abbildung 4.28: Links: Zerfallsassoziierte Spektren resultierend aus der GLA-Analyse der transienten Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C, D282C) solubilisiert in DDM. Rechts: Lebensdauerdichtekarte resultierend aus der LDA-Analyse der selben Messung.

Die LDA-Analyse liefert das gleiche Ergebnis: In der LDM (Abbildung 4.28 rechts) finden sich im Wesentlichen drei kinetisch relevante Lebensdauerbereiche. Die Dichteverteilung bei etwa 0,4 min spiegelt das zerfallsassoziierte Spektrum zur 0,4 min-Kinetik (blau) in der GLA-Analyse wider, während die Lebensdauerdichtedistributionen bei 10 min und etwa 70 min den zerfallsassoziierten Spektren zu den Zeitkonstanten 10 min (rot) beziehungsweise 56 min (gelb) aus der GLA-Analyse stark ähneln.

Um den 0,4 min-Prozess in einer besseren Zeitauflösung analysieren zu können, wurde eine weitere Blitzlichtphotolysemessung bis zu einer Verzögerungszeit von 60 s in 100 ms-Schritten durchgeführt. Die transiente Absorptionsänderung in diesem Zeitfenster ist in Abbildung 4.29 links dargestellt. Hier wird die Blauverschiebung des Absorptionsmaximums bei 450-500 nm zu etwa 390 nm deutlich. Die Kinetik dieses Prozesses wird in der LDA-Analyse (rechtes Bild in Abbildung 4.29) mit einer 25 s-Lebensdauer beschrieben, was sehr gut der gefundenen 0,4 min-Kinetik in der Messung von Abbildung 4.28 entspricht. Die unendliche Zeitkonstante in der GLA-Analyse beziehungsweise die Lebensdauerdichteverteilung zu sehr hohen Lebensdauern ( $\geq 1000$  min) in der LDA-Analyse spiegeln keinen kinetischen Prozess wider, sondern resultieren aus der nicht-verschwindenden Absorptionsänderung zur spätesten detektierten Verzögerungszeit (60 s nach Anregung der Probe). Diese Absorptionsänderung wird von den Analyseverfahren

als unendlich langsamer Prozess interpretiert.

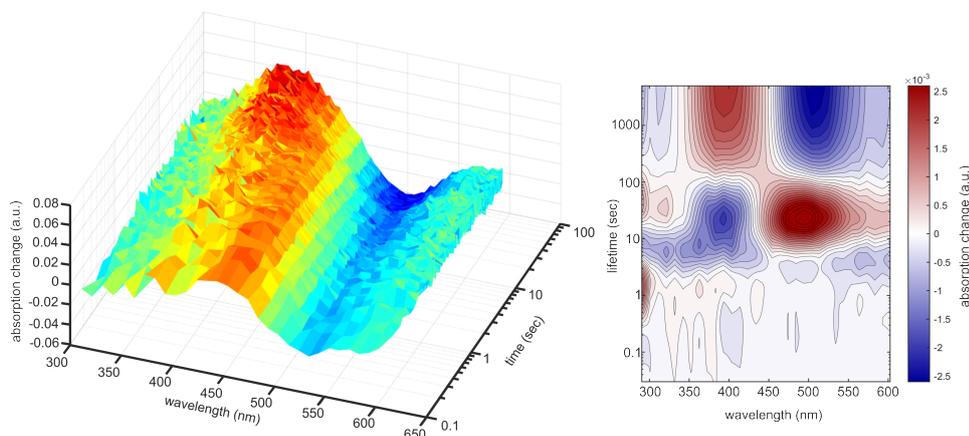


Abbildung 4.29: Links: Transiente Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C beziehungsweise D282C) solubilisiert in DDM (pH 6,5) bis zu einer Verzögerungszeit von 1 min bei einer Schrittweite von 100 ms. Rechts: Lebensdauerdichtekarte resultierend aus der LDA-Analyse dieser Messung.

In den bereits publizierten zeitaufgelösten Studien zur G90D-Mutante [373, 378] wurde keine Meta II-typische Signatur im blauen Spektralbereich festgestellt. Im Rhodopsin-Wildtyp ist die Schiff'sche Base des Retinals im Meta II-Zustand deprotoniert, da diese ihr Proton an E113 abgegeben hat. Wie bereits erwähnt, ist der Rest dieser Aminosäure bereits im Grundzustand der G90D-Mutante protoniert. Stattdessen wurde beobachtet, dass eine Species bei 468 nm zu Opsin beziehungsweise freiem Retinal zerfällt. Diese hat hohe Ähnlichkeiten in der Konformation zu Meta II des Wildtyps und kann Transducin aktivieren. Außerdem konnte mit Infrarotspektroskopie gezeigt werden, dass die Schiff'sche Base des Retinals in diesem Zustand protoniert und nicht deprotoniert vorliegt [367, 373, 379].

Die spektrale Charakteristik der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen 10 min-Kinetik legt nahe, dass die 10 min-Lebensdauer diesem Prozess (Zerfall dieses Meta II-ähnlichen Intermediats) zugeordnet werden kann. Ein weiterer Zerfall aus einem spektral breiteren und rotverschobenen Photoprodukt, wie er mit einer Zeitkonstante von 60-70 min festgestellt wird, ist in der Literatur nicht beschrieben. Allerdings ist in den entsprechenden Veröffentlichungen nicht ersichtlich, ob die Photodynamik zu späteren Verzögerungszeiten als 16 min detektiert wurde. Die spektrale Ähnlichkeit

dieser Signatur zu denen, die den Meta III-Zerfall vom Wildtyp und vom stabilisierten Rhodopsin beschreiben, lässt vermuten, dass sich auch im Photozerfall der G90D-Mutante ein Meta III-ähnlicher Zustand bildet, der schließlich zu Opsin und freiem Retinal zerfällt.

Jäger et al. berichten von einem Lumirhodopsin-ähnlichen Intermediat bei 480 nm, das zur Bildung des Meta II-ähnlichen Zustandes führt. Die Autoren beschreiben in ihren zeitaufgelösten Absorptionsmessungen außerdem einen Zerfall von einem Bathorhodopsin/BSI-Mischzustand zu Lumirhodopsin in etwa 200 ns. Den Übergang von Bathorhodopsin zu BSI konnten sie aufgrund limitierter Zeitauflösung nicht messen und vermuten dass dieser innerhalb von 20 ns geschieht. Die Bildung des Meta II-ähnlichen Intermediats (die Autoren nennen es ein Meta I-ähnliches, Transducin aktivierendes Intermediat) aus dem Zerfall von Lumirhodopsin, beobachten sie mit einer Zeitkonstante von 9,3 ms. Die Experimente wurden bei 10°C und pH 7,0 durchgeführt. In der Publikation werden Absorptionsänderungen nur bis zu einer Verzögerungszeit von 10 ms erwähnt und analysiert. Es wird nicht ersichtlich, ob auch zu späteren Verzögerungszeiten detektiert wurde. Wenn die Analyse auf transienten Daten bis zu 10 ms Verzögerungszeit beruhen, ist unklar ob die 9,3 ms-Zeitkonstante die Zerfallskinetik von Lumirhodopsin unter deren experimentellen Bedingungen vollständig beschreibt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Absorptionsmessung dieser Mutante mit vergleichbarer Zeitauflösung (Millisekunden) durchgeführt. Die von Jäger et al. gefundene Kinetik des Zerfalls von Lumirhodopsin im Millisekundenbereich, kann folglich weder bestätigt noch widerlegt werden. Die Messung im Sekundenbereich (siehe Abbildung 4.29) legt allerdings nahe, dass ein wesentlich langsamerer Zerfall von Lumirhodopsin oder einem Lumirhodopsin-ähnlichen Intermediat stattfindet: Das positive Maximum in der Lebensdichteverteilung der 25 s-Kinetik (Abbildung 4.29 rechts) kommt spektral dem Lumirhodopsin gleich. Insofern lässt sich die 25 s-Dynamik als Zerfall von Lumirhodopsin interpretieren. Ob die negative Signatur bei 390 nm die Akkumulation von freien Retinalen beschreibt oder ob es sich um die Bildung eines Intermediats mit deprotonierter Schiff'schen Base handelt, lässt sich nicht sagen. Letztere Interpretation würde bedeuten, dass (vorausgesetzt es handelt sich hierbei um kein extrem langlebiges Intermediat) zu späteren Zeiten ein entsprechender Absorptionszerfall beobachtet werden müsste. Dies konnte hier nicht festgestellt werden.

Die Bildung der Meta-Zustände konnte nicht beobachtet werden. Wie schnell und aus welchem Intermediat sich diese bilden bleibt vorerst unklar. Es ist möglich, dass sich diese aus dem Zerfall von Lumirhodopsin bilden, obwohl ein solcher Übergang hier nicht erfasst werden konnte. Denn das verhältnismäßig kleine Signal-zu-Rausch-Verhältnis könnte verhindern, dass ein Übergang zwischen spektral ähnlichen Intermediaten (wie es bei Meta I und Lumirhodopsin der Fall ist) in der Datenanalyse erkannt wird.

### Die frühe Photodynamik

In einer Tieftemperatur-FTIR-Studie[374] konnten Unterschiede im IR-Bereich zwischen frühen Photoprodukten von G90D und Wildtyp-Bathorhodopsin festgestellt werden. Es wurde beobachtet, dass sowohl die  $C_{12}$ - $C_{13}$ -Streckschwingung als auch HOOP-Moden in der Mutante rotverschoben sind[380, 381]. Als Grund für diese Beobachtung wird vermutet, dass der E113-Rest im neutralen Zustand die elektrostatische Umgebung des Chromophors stört. Die größeren beobachteten Amid I-Absorptionsänderungen in der Mutante (verglichen mit Wildtyp) lassen außerdem vermuten, dass der Bindebereich des Retinals flexibler ist[374].

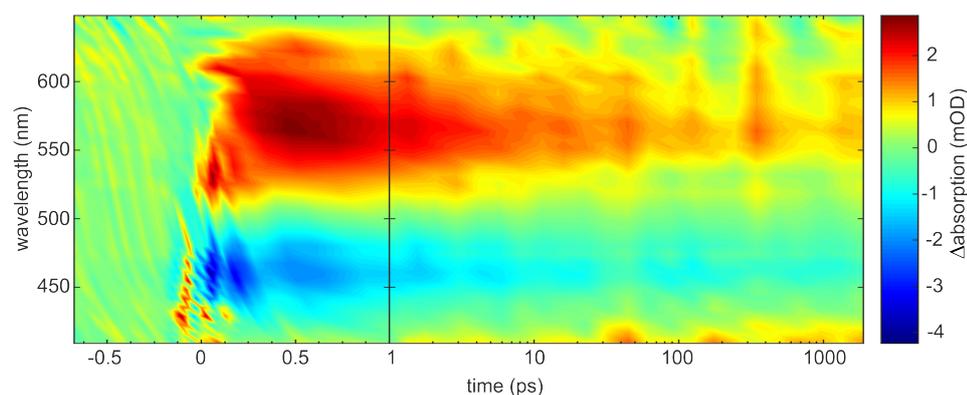


Abbildung 4.30: Ultraschnelle transiente Absorption der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C, D282C) solubilisiert in DDM (pH 6,5) bei Anregung mit einem 490 nm-Lichtpuls (50 nJ).

Um zu untersuchen, wie sich die G90D-Mutante in ihrer primären Photodynamik verhält, wurde die ultraschnelle photoinduzierte Absorptionsänderung

ung dieser Mutante bis zu einer Verzögerungszeit von etwa 1,9 ns gemessen. Die transienten Daten sind in Abbildung 4.30 in Form einer 2D-Darstellung gezeigt. Die Probe wurde bei 490 nm mit 50 nJ angeregt.

Das kleine Signal-zu-Rausch-Verhältnis in diesem Experiment erschwert die Auswertung des transienten Datensatzes. Das kohärente Artefakt wurde wie üblich gefittet und vom Datensatz abgezogen und dabei der Chirp des Weißlichts korrigiert. Je schlechter das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist, desto schwieriger ist es in dieser Fitroutine, Rauschen von Messartefakten und von photoinduzierten Absorptionsänderungen der Probe zu unterscheiden. Aus diesem Grund ist der Zeitbereich bis einige hundert Femtosekunden Verzögerungszeit nur beschränkt auswertbar.

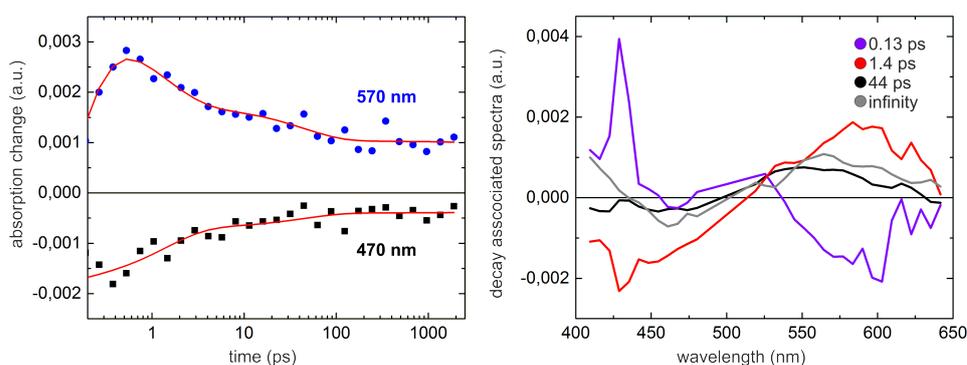


Abbildung 4.31: Links: Transiente Verläufe bei 580 und 500 nm der stabilisierten Rhodopsinmutante G90D (und N2C beziehungsweise D282C) in DDM mit Fit aus der GLA-Analyse (rot). Rechts: Zerfallsassoziierte Spektren resultierend aus der GLA-Analyse der transienten Absorption.

In Abbildung 4.31 links sind zwei transiente Verläufe bei 570 und 470 nm in blau beziehungsweise schwarz aufgetragen. Der rote Verlauf stellt jeweils den Fit aus der GLA-Analyse dar. Die zerfallende bathochrome Flanke der breiten positiven Absorption in der Ultrakurzzeitdynamik des stabilisierten Rhodopsins (siehe Abbildung 4.25) ist auch in der G90D-Dynamik (siehe Abbildung 4.30) in ähnlicher Weise zu beobachten. Ebenso zeigt sich eine innerhalb dieser Zeitskala nicht-verschwindende negative (positive) Absorption bei etwa 460 nm (560 nm). Ein Unterschied macht sich allerdings in der spektralen Position dieser beiden Signaturen bemerkbar: Beide scheinen hypsochrom zu denen des stabilisierten Rhodopsins verschoben zu sein (sie-

he Vergleich mit Abbildung 4.25), was vermutlich mit dem ebenfalls hypsochrom verschobenen Absorptionsmaximum des Grundzustands zusammenhängt (siehe Abbildung 4.20).

Der sinnvollste Fit dieser Messung wurde in der GLA-Analyse mit drei Zeitkonstanten und einer unendlichen Komponente erreicht. Aus genannten Gründen ist es wahrscheinlich, dass die schnellste Zeit von 0,13 ps nur partiell die frühe Kinetik der Mutante widerspiegelt. Nichtsdestotrotz weist ihr DAS-Spektrum in Abbildung 4.31 rechts eine negative Struktur um etwa 580 nm auf, was vermutlich die Bildung von Photorhodopsin beschreibt. Dieser Prozess konnte im gleichen Experiment weder beim stabilisierten Rhodopsin noch beim Wildtyp kinetisch erfasst werden (siehe Abbildung 4.26). Dies zeigt, dass die Bildung von Photorhodopsin durch die G90D-Mutation zeitlich verzögert zu sein scheint. Grund hierfür sind zum einen das gestörte Wasserstoffbrückennetzwerk (und damit zusammenhängend der protonierte E113-Rest) und zum anderen sterische Hinderungen durch den Austausch von Glycin mit der platzeinnehmenderen Asparaginsäure.

Ähnlich wie die 21 ps-Kinetik des stabilisierten Rhodopsins (Abbildung 4.26), weist auch die G90D-Mutante einen Absorptionszerfall bei 580 nm auf, der allerdings mit 1,4 ps schneller ist. Vermutlich handelt es sich hierbei um den Zerfall von Photorhodopsin. Die gleichzeitige Akkumulation von Bathorhodopsin ist in der G90D-Mutante blauverschoben zu vermuten, wie sich aus dem DAS-Spektrum zu der 1,4 ps-Zeitkonstante interpretieren lässt. Der (zumindest partielle) Zerfall von Bathorhodopsin (siehe zerfallsassoziiertes Spektrum zur Zeitkonstante 44 ps, Abbildung 4.31 rechts) ist in der spektralen Signatur der DAS in der Kinetik des stabilisierten Rhodopsins wiederzufinden (siehe zerfallsassoziiertes Spektrum zur Zeitkonstante 1 ns, Abbildung 4.26 rechts). Allerdings unterscheiden sich die beiden Zeitkonstanten erheblich voneinander. Interessanterweise hat die Analyse der Kinetik des Wildtyps ergeben, dass Bathorhodopsin biexponentiell mit 50 ps und 1 ns zerfällt. Insofern ist es denkbar, dass in diesen ebenfalls ein Zerfall von Bathorhodopsin mit zwei Zeitkonstanten im Piko- und Nanosekundenbereich stattfindet, der aufgrund der verhältnismäßig großen Unsicherheiten in den Messungen der Rhodopsinmutanten jedoch nicht in der Datenanalyse erfasst werden kann.

Einen weiteren Unterschied zwischen G90D und dem stabilisierten Rhodopsin zeigt ein Vergleich der zerfallsassoziierten Spektren zu den unendlichen

Zeitkonstanten: Die Bleichbande bei etwa 500 nm beim stabilisierten Rhodopsin ist bei der G90D-Mutante nicht wiederzufinden beziehungsweise ist stark in den blauen Spektralbereich zu etwa 460 nm verschoben. Es ist denkbar, dass es sich bei dieser Signatur im blauen Spektralbereich um das Intermediat BSI handelt, welches bereits in anderen Experimenten im Gleichgewicht mit Bathorhodopsin gefunden wurde[378].

Für ein vollständiges Bild der Kinetik dieser frühen Prozesse im Nanosekundenbereich, sind in Zukunft weitere zeitaufgelöste Experimente durchzuführen, die mindestens die Zeitskala von einigen hundert Pikosekunden bis einigen hundert Nanosekunden erfassen sollten.

### 4.6.3 Zusammenfassung

Die zeitaufgelösten Absorptionseigenschaften der mit Nachtblindheit assoziierten, stabilisierten Dreifach-Mutante G90D (und N2C, D282C) wurde mit Blitzlichtphotolyseexperimenten und Ultrakurzzeitmessungen im UV-Vis-Bereich untersucht. Unter gleichen Bedingungen (Raumtemperatur, pH 6,5, solubilisiert mit DDM) wurde analog dazu die Photodynamik des stabilisierten Rhodopsins (Mutationen N2C und D282C) und des Wildtyps gemessen. Die gefundenen Zeitkonstanten sind in Abbildung 4.32 zusammengefasst (schwarze Zahlen). In der Darstellung zur Photodynamik des Wildtyps (Abbildung 4.32 oben) sind außerdem zeitliche Abschätzungen aus der Literatur für Übergänge angegeben, die im Rahmen dieser Arbeit nicht gemessen wurden (in grau).

### Stabilisiertes Rhodopsin

Die primäre Photoreaktion - die Bildung von Photorhodopsin - konnte weder beim stabilisierten Rhodopsin noch beim Wildtyp detektiert werden, da dieser Prozess vermutlich unterhalb der Zeitauflösung des Experiments ist. Der Zerfall von Photorhodopsin zu Bathorhodopsin scheint etwa vierfach langsamer als im Wildtyp zu sein. Ein biexponentieller Zerfall von Bathorhodopsin konnte für stabilisiertes Rhodopsin nicht festgestellt werden. Eine Zeitkonstante im Nanosekundenbereich konnte zwar wie im Wildtyp gefunden werden, eine zweite Zeitkonstante im Pikosekundenbereich (wie beim Wildtyp)

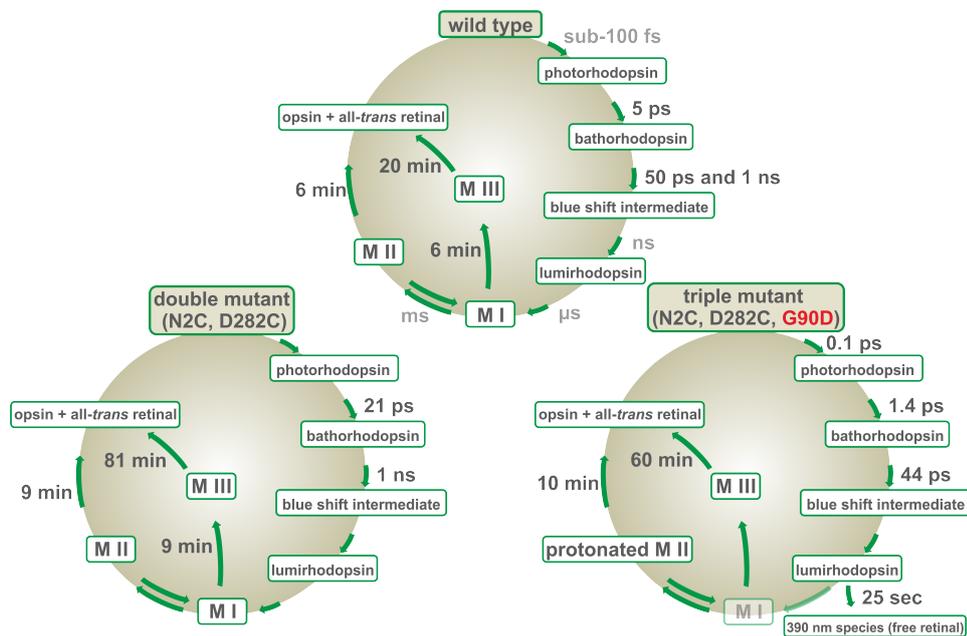


Abbildung 4.32: Kinetisches Modell des Photozerfalls von Rhodopsin in DDM. Die Darstellung oben bezieht sich auf den Wildtyp, unten links auf stabilisiertes Rhodopsin (Mutationen N2C und D282C) und unten rechts auf die stabilisierte G90D-Mutante. Die Zahlenwerte beziehen sich auf die in dieser Arbeit gefundenen Zeitkonstanten. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur und pH 6,5 durchgeführt.

konnte für diesen Prozess allerdings nicht gefunden werden. Aufgrund der hohen Unsicherheiten in diesen Messungen ist es allerdings möglich, dass ein solcher biexponentieller Prozess durchaus stattfindet, dieser jedoch nicht von der Datenanalyse erfasst werden kann.

In einer Blitzlichtphotolysemessung wurde die Dynamik auf einer Minutenskala detektiert. Die Photodynamik im Nanosekunden- bis Sekundenregime wurde bisher noch nicht erfasst und bedarf für eine zeitlich lückenlose Detektion der Etablierung weiterer Messtechniken.

Im Wildtyp zerfällt das aktive Intermediat Meta II und Meta III mit einer Zeitkonstante von 6 min beziehungsweise 20 min. In diesen Schritten hydrolysiert die Schiff'sche Base. Es bildet sich freies all-*trans*-Retinal und Opsin. Dieser biphasige Prozess findet auch im stabilisierten Rhodopsin statt, allerdings mit 9 min (Meta II) und 81 min (Meta III). In den bisherigen zeitaufgelösten Studien zu dieser Doppelmutante wurde bisher lediglich die Zerfallskinetik von Meta II und Meta III gleichzeitig betrachtet ohne diese kinetisch voneinander zu trennen. Hier zeigt sich nun, dass die Zerfallski-

netik sowohl von Meta II als auch Meta III wesentlich beeinflusst ist: Die Zerfallsdauer von Meta II wird etwa 50 % langsamer und die von Meta III vervierfacht sich. Es ist anzunehmen, dass die Stabilisierung des Proteins im extrazellulären Bereich durch die Disulfidbrücke letztlich zur Stabilisierung der kovalenten Bindung des Retinals am Lysinrest führt.

### Stabilisierte G90D-Mutante

In der stabilisierten G90D-Mutante lässt sich - im Gegensatz zum stabilisierten Rhodopsin und dem Wildtyp - die Kinetik der Primärreaktion erfassen. Die Bildung von Photorhodopsin wird mit einer Zeitkonstante von etwa 0,13 ps beobachtet. Da diese Zeit im Bereich der Zeitauflösung des Experiments liegt, hat dieser Zahlenwert eine relativ große Unsicherheit. Die Tatsache allerdings, dass dieser Prozess in der G90D-Mutante beobachtet wurde und weder im Wildtyp noch im stabilisierten Rhodopsin detektiert werden konnte, legt nahe, dass dieser Schritt der Isomerisierung durch die G90D-Mutation verlangsamt ist. Wie bereits erwähnt, liegt E113 in dieser Mutante im Dunkelzustand bereits protoniert vor ( $pK_S$  Wert stark erhöht). E113 kann folglich nicht als Gegenion zur protonierten Schiff'schen Base dienen und D90 bildet das Gegenion. Diese erhebliche Störung in der chemischen Umgebung des Retinals wirkt sich nicht nur auf die Absorptionseigenschaften des Dunkelzustands aus (Spektrum des G90D-Dunkelzustands ist relativ zur Absorption des Wildtyps um etwa 15 nm blauverschoben), sondern scheint auch die Photoisomerisierung und somit die Bildung von Photorhodopsin zu beeinflussen. Eine Verlangsamung dieses Prozesses kann darüberhinaus auch mit sterischen Hinderungen in Zusammenhang stehen, da Asparaginsäure mehr Platz in der Retinalbindetasche einnimmt als Glycin.

Der Übergang von Photorhodopsin zu Bathorhodopsin (1,4 ps) ist etwa eine Größenordnung schneller als in der Photodynamik des stabilisierten Rhodopsins (21 ps). Die Bildung und der Zerfall des Intermediats Bathorhodopsin kann wie beim stabilisierten Rhodopsin auch in der stabilisierten G90D-Mutante beobachtet werden. Die Kinetik des Zerfalls von Bathorhodopsin zu BSI (44 ps) unterscheidet sich vom stabilisierten Rhodopsin (1 ns) erheblich. Hierzu sei darauf aufmerksam gemacht, dass diese beiden Zeitkonstanten den biexponentiellen Zerfall von Bathorhodopsin im Wildtyp beschreiben.

Insofern ist es denkbar, dass in der Photodynamik sowohl der stabilisierten G90D-Mutante als auch des stabilisierten Rhodopsins eine entsprechende biexponentielle Kinetik des Zerfalls von Bathorhodopsin stattfinden könnte, die aufgrund eines unzureichenden Signal-zu-Rausch Verhältnisses in der Datenanalyse nicht erfasst werden kann.

Mit einer Zeitkonstante von 25 s wurde der Zerfall eines Intermediates beobachtet, dessen Absorptionsmaximum bei etwa 495 nm liegt. Dies kommt spektral dem Lumirhodopsin des Wildtyps gleich. Insofern wird dieses Intermediat der G90D-Photodynamik als Lumirhodopsin-ähnliche Species interpretiert. Aus diesem Zustand bildet sich eine Absorptionsbande bei 390 nm. Es kann sich hierbei um freies Retinal handeln, welches möglicherweise aus der Hydrolyse der Schiff'schen Base erfolgt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich um ein Intermediat handelt mit deprotonierter Schiff'schen Base. Da allerdings in der Datenanalyse keine klare Signatur zu finden ist, die einen Zerfall dieses Zustands beschreibt, bleibt offen, ob dessen Zerfall sehr langsam nach 120 min (späteste detektierte Verzögerungszeit) passiert oder ob das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den Messungen zu klein ist für die Registrierung dieses Prozesses.

Die Bildung von Opsin und freiem Retinal erfolgt in der Photodynamik von G90D biphasig über zwei Intermediate. Die Species, die bei etwa 460 bis 520 nm absorbiert, zerfällt mit einer Zeitkonstante von etwa 60 min und wird als Meta III-Zustand interpretiert. Das andere Intermediat hat sein Absorptionsmaximum bei etwa 470 nm und zerfällt mit 10 min. Wie bereits erläutert, konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass die Mutante in diesem Zustand Transducin bindet[373] und deshalb wie Meta II (Wildtyp) als aktives Intermediat bezeichnet wird. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Schiff'sche Base in diesem Intermediat protoniert ist[374]. Insofern wird dieser aktive Zustand als Meta II-ähnliches Intermediat mit protonierter Schiff'scher Base interpretiert. Im Vergleich zum stabilisierten Rhodopsin zeigt sich, dass die G90D-Mutation zu einem etwa 26 % schnelleren Zerfall von Meta III führt, während die Kinetik von Meta II nahezu unverändert bleibt. Über die Existenz eines Meta I-ähnlichen Intermediats lassen sich basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen im sichtbaren Spektralbereich keine Aussagen treffen, da sie in diesem Bereich kaum zu unterscheiden wären. Denn im Wildtyp unterscheidet sich Meta I von Meta II (neben der Unterschiede einer aktiven beziehungsweise

inaktiven Konformation des Proteins) im Wesentlichen durch den Protonierungszustand der Schiff'schen Base des all-*trans* Retinals, während eine solche Protonierungsänderung bei der Bildung des (protonierten) Meta II-ähnlichen Zustands der G90D-Mutante nicht stattzufinden scheint. Insofern bleibt die Frage offen, ob ein Meta I-ähnlicher Zustand im Photozerfall der G90D-Mutante existiert oder ob sich das protonierte Meta II Intermediat aus dem Zerfall von Lumirhodopsin bildet. Aufgrund dieser Überlegungen ist Meta I im Modell der stabilisierten G90D-Mutante in Abbildung 4.32 nur angedeutet. Die Bildung der Meta-Zustände konnte nicht beobachtet werden. Dennoch ist es denkbar, dass dieser Prozess aus dem Zerfall von Lumirhodopsin erfolgt und aufgrund zu hoher spektraler Ähnlichkeit mit Meta I beziehungsweise protoniertem Meta II bei den in den Messungen gegebenen Unsicherheiten nicht erfasst werden kann.

In Zukunft werden weitere Messungen noch durchzuführen sein, die zum einen eine bessere spektrale Unterscheidung zwischen den Intermediaten liefern und zum anderen mehr Informationen über das Retinal und seine Umgebung (Schwingungsbanden) geben als es im sichtbaren Bereich möglich ist. Aus diesem Grund sind zeitaufgelöste Messungen im infraroten Spektralbereich geplant.

Außerdem sind sowohl im sichtbaren als auch im infraroten Bereich weitere transiente Absorptionsexperimente in Planung, die den in dieser Arbeit nicht detektierten Zeitbereich zwischen Nanosekunden und Sekunden erfasst, um ein vollständiges Bild des Photozerfalls sowohl der stabilisierten G90D-Mutante als auch des stabilisierten Rhodopsins und des Wildtyps zu erhalten.

Darüberhinaus sollte in Zukunft die G90D-Mutante ohne die stabilisierende Disulfidbrücke untersucht werden, um näher an das kinetische Verhalten der Nachtblindheit verursachenden Einfachmutante G90D zu kommen.



## Kapitel 5

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dynamik zweier grundlegend verschiedener, deaktivierender Mechanismen von Retinalproteinen untersucht. In einem dritten Projekt wurde die Photodynamik einer Dreifachmutante von visuellem Rhodopsin erforscht, von der eine Mutation zu kongenitaler (angeborener) Nachtblindheit führt und zwei andere Mutationen das Protein über eine Disulfidbrücke stabilisieren. Die Ergebnisse dieser drei Projekte sind im Folgenden zusammengefasst.

Die Aktivität des mikrobiellen Proteorhodopsins als lichtgetriebene Protonenpumpe kann photoinduziert unterbunden werden. Dies erfolgt durch die Absorption von blauem Licht durch das Retinal bei deprotonierter Schiff-schen Base. Vor dieser Arbeit war allerdings nur wenig über den Mechanismus und die Kinetik dieses Effekts bekannt. Das einzige Retinalprotein, an dem diese Deaktivierungsdynamik auf molekularer Ebene zeitaufgelöst untersucht wurde, ist Bakteriorhodopsin. Doch auch an diesem System wurde die ultraschnelle Primärreaktion in der photoinduzierten Deaktivierungsdynamik - die Photoisomerisierung des 13-*cis*-Retinals - bisher nicht zeitaufgelöst gemessen.

In dieser Arbeit wurde ein Weg gefunden, diesen Prozess auf einer Sub-Pikosekundenzeitskala zu detektieren. Dazu wurde eine Proteorhodopsinmutante genutzt, in der der primäre Protonendonator E108 durch Glutamin ersetzt ist. Diese Mutante weist eine signifikante Erhöhung der Lebensdauer des M-Intermediats auf. Im photostationären Gleichgewicht führt diese ver-

änderte Kinetik zu einer erheblich erhöhten Akkumulation des Proteins im M-Zustand, die ausreicht, um photoinduzierte Absorptionsänderungen der Deaktivierungsdynamik sowohl im sichtbaren als auch im mittleren Infrarotbereich auf ultrakurzer Zeitskala zu detektieren. Dieses Projekt erfolgte in Kooperation mit dem Arbeitskreis Glaubitz (Goethe-Universität Frankfurt am Main).

Es zeigte sich, dass die Anregung des Retinals von Proteorhodopsin im M-Zustand zur Isomerisierung von 13-*cis* zu all-*trans* führt, die nach wenigen Pikosekunden abgeschlossen ist. Der zweite und abschließende Schritt ist die Reprotonierung der Schiff'schen Base. Es stellte sich heraus, dass dieser Prozess auf einer Nanosekundenzeitskala abläuft und über einen Protonentransfer vom primären Protonenakzeptor D97 zur Schiff'schen Base ermöglicht ist.

Ein Vergleich mit der Deaktivierungsdynamik von Bakteriorhodopsin liefert im Wesentlichen zwei Unterschiede: 1) Die Reprotonierung der Schiff'schen Base bei Proteorhodopsin läuft mit zwei Größenordnungen Unterschied erheblich schneller ab. 2) Der spektrale Abstand zwischen M' (das primäre Photoprodukt von M) und M ist in Proteorhodopsin (50 nm) deutlich größer als in Bakteriorhodopsin (15 nm). Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte der sehr hohe  $pK_S$ -Wert des primären Protonenakzeptors D97 von Proteorhodopsin sein.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methodik zur Untersuchung der deaktivierenden Photodynamik von Proteorhodopsin auf ultraschneller Zeitskala, könnte in Zukunft auf weitere mikrobielle Rhodopsine angewandt werden. So ist die Studie der Deaktivierungsdynamik von Channelrhodopsinen von großem Interesse für optogenetische Anwendungen. Eine lichtgesteuerte Kontrolle der Ionenkanalöffnung und -schließung sollte die Präzision in der Regulierung ionischer Permeation erheblich verbessern.

Die Proteorhodopsinmutante E108Q wurde außerdem in ihrer primären Photodynamik sowohl bei grünem als auch blauem Anregungslicht untersucht. Es zeigte sich in beiden Fällen eine Dynamik, die der des Wildtyps sehr ähnlich ist. Eine Beobachtung unterscheidet sich jedoch wesentlich vom Wildtyp. Das K-Intermediat der E108Q-Mutante scheint nach einigen hundert Pikosekunden zumindest partiell zu zerfallen, woraufhin sich eine Signatur im blauen Spektralbereich bildet. Blitzlichtphotolysemessungen lassen vermuten, dass diese blau absorbierende Species im zwei- bis dreistelligen

---

Nanosekundenbereich wieder zerfallen sein muss.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Photozerfall von visuellem Rhodopsin. Es ist bekannt, dass die Signaltransduktion durch Wechselwirkung zwischen aktiviertem Rhodopsin und Arrestin unterbunden wird. Im ersten Abschnitt wurde der Einfluss der Arrestin-1-Variante p44 auf die Photodynamik visuellen, bovinen Rhodopsins untersucht. In einer Kooperation mit dem Arbeitskreis Schwalbe (Goethe-Universität Frankfurt am Main) konnte gezeigt werden, dass Arrestin erheblichen Einfluss auf die Zerfallsdynamik von Meta II und Meta III hat. Es wurde festgestellt, dass die Wechselwirkung von p44 mit photoaktiviertem Rhodopsin eine erhöhte Population des Intermediats Meta III bewirkt, mit der Folge einer zweifach langsameren Freisetzungskinetik des all-*trans*-Retinals. Diese Beobachtung weist auf eine physiologische Rolle des Zustands Meta III in der Retinalhomöostase hin.

Gegenstand einer zweiten Studie mit dem Arbeitskreis Schwalbe ist zum einen die Rhodopsinmutation G90D, die mit kongenitaler (angeborener) stationärer Nachtblindheit zusammenhängt, und zum anderen die Doppelmutation N2C und D282C, die zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den im extrazellulären Bereich eingeführten Cysteinen führt. Diese Brückenbindung wirkt stabilisierend auf das Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Photodynamik des Wildtyps, der Doppelmutante (N2C und D282C) und der stabilisierten G90D-Mutante (Mutationen G90D, N2C und D282C) im UV-Vis-Bereich sowohl auf einer ultrakurzen Zeitskala als auch auf einer Minutenskala untersucht.

Die Analyse der zeitaufgelösten Messungen an stabilisiertem Rhodopsin (Doppelmutante N2C und D282C) zeigt auf, dass die Einführung der Disulfidbrücke eine deutlich verlangsamte Kinetik in der Zerfallsdynamik von Meta II und Meta III verursacht. Die Zerfallsdauer von Meta II wird etwa 50 % langsamer und die von Meta III vervierfacht sich. Dies zeigt, dass die Disulfidbrücke die kovalente Bindung des Retinals in den späten Intermediaten stabilisiert und die Hydrolyse verzögert.

Die zeitaufgelösten Absorptionmessungen der stabilisierten G90D-Mutante lassen vermuten, dass die Isomerisierung durch die Mutation zeitlich verzögert stattfindet. Grund für diese Beobachtung können zum einen sterische Hinderungen durch den Rest der Asparaginsäure D90 und zum anderen

Störungen des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks in der Retinalbindetasche und des veränderten Protonierungszustands von E113 sein (das Gegenion der deprotonierten Schiff'schen Base im Wildtyp).

Außerdem wurde beobachtet, dass die G90D-Mutante eine schnellere Retinalfreisetzung aufweist, die im Wesentlichen auf eine etwa 26 % kürzere Lebensdauer des Meta III-Zustands zurückzuführen ist (verglichen mit stabilisiertem Rhodopsin) und nicht auf eine Änderung der Meta II-Kinetik, wie es in anderen Studien behauptet wurde.

An der stabilisierten G90D-Mutante wurde zusätzlich beobachtet, dass ein Lumirhodopsin-ähnliches Intermediat mit 25 s zu einer Species zerfällt, die bei etwa 390 nm absorbiert. Vermutlich handelt es sich hierbei um die Absorption freigesetzter Retinale. Dies würde bedeuten, dass der Photozerfall von G90D bereits vor der Bildung der Meta-Zustände zur Freisetzung des Retinals führen kann. Dies kann wiederum damit zusammenhängen, dass die Schiff'sche Base bereits im Grundzustand aufgrund von konkurrierender Wechselwirkungen mit D90 und E113 destabilisiert vorliegt, was die Retinalfreisetzung durch Hydrolyse möglicherweise begünstigt.

## Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind

- **Eckert, C.E.**, Kaur, J., Glaubitz, C., Wachtveitl, J., *Ultrafast Photo-induced Deactivation Dynamics of Proteorhodopsin*, **J. Phys. Chem. Lett.**, 8 (2), 512-517, **2017**
- **Eckert, C.E.**/Chatterjee, D., Slavov, C., Saxena, K., Fürtig, B., Sanders, C. R., Gurevich, V.V., Wachtveitl, J., and Schwalbe, H., *Influence of Arrestin on the Photodecay of Bovine Rhodopsin*, **Angew. Chem. Int. Ed.**, 54, 13555-13560, **2015**
- **Eckert, C.E.**/Chatterjee, D., Slavov, C., Saxena, K., Fürtig, B., Sanders, C. R., Gurevich, V.V., Wachtveitl, J., and Schwalbe, H., *Influence of Arrestin on the Photodecay of Bovine Rhodopsin*, **Angew. Chem.**, 127, 13759-13764, **2015**
- Mehler, M., **Eckert, C.E.**, Busche, A., Kulhei, J., Michaelis, J., Becker-Baldus, J., Wachtveitl, J., Dötsch, V. and Glaubitz, C., *Assembling a correctly folded and functional heptahelical membrane protein by protein transplicing*, **J. Biol. Chem.**, 290 (46), 27712-27722, **2015**

### Eingereichte Publikation:

- Mehler, M., **Eckert, C.E.**, Leeder, A., Kaur, J., Fischer, T., Kubatova, N., Brown, L.J., Brown, R.C.D., Becker-Baldus, J., Wachtveitl, J., Glaubitz, C., *Chromophore Distortions in Photointermediates of Proteorhodopsin visualized by DNP-enhanced solid-state NMR*, eingereicht bei **J. Am. Chem. Soc.**

## Weitere Publikationen

- Bradler, M., Nielsen, V.D., **Eckert, C.E.**, and Riedle, E., *A broad and tunable 250-to 430-nm source for microscopy and lifetime measurements by frequency doubling of a 78-MHz-picosecond white-light laser*, **Appl. Phys. B – Lasers and Optics**, 116 (4), 875-882, **2014**

## Konferenzbeiträge

- **Eckert, C.E.**, Kaur, J., Glaubitz, C., Wachtveitl, J., *The Blue-Light Quenching Effect of Proteorhodopsin*, **EMBO Retinal Proteins Conference**, Potsdam, Deutschland, 2016 (Vortrag)
- **Eckert, C.E.** and Chatterjee, D., Slavov, C., Saxena, K., Fürtig, B., Sanders, C. R., Gurevich, V.V., Wachtveitl, J., and Schwalbe, H., *Arrestin Splice-variant p44 Delays Retinal Release from Photoactivated Rhodopsin via Meta III*, **EMBO Retinal Proteins Conference**, Potsdam, Deutschland, 2016 (Poster)
- **Eckert, C.E.** and Chatterjee, D., Slavov, C., Saxena, K., Fürtig, B., Sanders, C. R., Gurevich, V.V., Wachtveitl, J., and Schwalbe, H., *Arrestin Splice-variant p44 Delays Retinal Release from Photoactivated Rhodopsin via Meta III*, **The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015**, Honolulu, Hawaii, USA, 2015 (Poster und Vortrag)
- Pugliesi, I., Krebs, N., **Eckert, C.E.**, Riedle, E., *Ultrabroad 2D-UV Spectroscopy with Cross-peaks: Photophysical and Photochemical Dynamics in the UV*, **6th International Conference on Coherent Multidimensional Spectroscopy**, Berlin, 2012



# Literaturverzeichnis

- [1] A. Goyal, B. Szarzynska, and C. Fankhauser, *Trends in Plant Science* **18**, 393 (2013).
- [2] T. Sakai et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 6969 (2001).
- [3] M. Wada, T. Kagawa, and Y. Sato, *Annual Review of Plant Biology* **54**, 455 (2003).
- [4] M. Ahmad and A. R. Cashmore, *Nature* **366**, 162 (1993).
- [5] A. Mueller, S. Sagasser, W. Wiltschko, and B. Schierwater, *Naturwissenschaften* **91**, 585 (2004).
- [6] H. Mouritsen et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 14294 (2004).
- [7] Y. Shichida and H. Imai, *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 1299 (1998).
- [8] Y. Shichida and T. Morizumi, *Photochemistry and Photobiology* **83**, 70 (2007).
- [9] K. P. Hofmann et al., *Trends in Biochemical Sciences* **34**, 540 (2009).
- [10] W. B. Vanti et al., *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **11**, 1861 (2001).
- [11] B. Scharf, B. Pevec, B. Hess, and M. Engelhard, *European Journal of Biochemistry* **206**, 359 (1992).
- [12] J. Sasaki and J. L. Spudich, *Photochemistry and Photobiology* **84**, 863 (2008).

- 
- [13] M. Kolbe, H. Besir, L. Essen, and D. Oesterhelt, *Science* **288**, 1390 (2000).
- [14] E. Bamberg, J. Tittor, and D. Oesterhelt, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 639 (1993).
- [15] J. K. Lanyi, *The Journal of Physical Chemistry B* **104**, 11441 (2000).
- [16] J. K. Lanyi, *Annual review of physiology* **66**, 665 (2004).
- [17] D. Oesterhelt, *Current opinion in structural biology* **8**, 489 (1998).
- [18] K. Inoue et al., *Nature Communications* **4**, 1678 (2013).
- [19] I. Gushchin et al., *Structural & Molecular Biology* (2015).
- [20] P. Nogly and J. Standfuss, *Nature Structural & Molecular Biology* **22**, 351 (2015).
- [21] G. Nagel et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 13940 (2003).
- [22] O. A. Sineshchekov, K.-H. Jung, and J. L. Spudich, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 8689 (2002).
- [23] F. Schneider, C. Grimm, and P. Hegemann, *Annual Review of Biophysics* **44**, 167 (2015).
- [24] L. A. Gunaydin et al., *Nature Neuroscience* **13**, 387 (2010).
- [25] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth, *Nature Neuroscience* **8**, 1263 (2005).
- [26] P. Ormos, Z. Dancsházy, and B. Karvaly, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **503**, 304 (1978).
- [27] B. Karvaly and Z. Dancsházy, *FEBS Letters* **76**, 36 (1977).
- [28] O. Bèjà et al., *Science* **289**, 1902 (2000).
- [29] O. Bèjà, E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc, and E. F. DeLong, *Nature* **411**, 786 (2001).
- [30] A. Modzelewska, S. Filipek, K. Palczewski, and P. S.-H. Park, *Cell Biochemistry and Biophysics* **46**, 1 (2006).

- 
- [31] M. E. Sommer, D. L. Farrens, J. H. McDowell, L. A. Weber, and W. C. Smith, *Journal of Biological Chemistry* **282**, 25560 (2007).
- [32] P. A. Sieving et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 880 (1995).
- [33] A. Singhal et al., *EMBO Reports* **17**, 1431 (2016).
- [34] *Princeton Instruments, PI-MAX 3 system manual*, 2013.
- [35] E. Riedle et al., *Applied Physics B* **71**, 457 (2000).
- [36] J. Piel, M. Beutter, and E. Riedle, *Optics Letters* **25**, 180 (2000).
- [37] T. Wilhelm and E. Riedle, *Optics and Photonics News* **8**, 50 (1997).
- [38] T. Wilhelm, J. Piel, and E. Riedle, *Optics Letters* **22**, 1494 (1997).
- [39] K. Neumann, *Untersuchung ultraschneller Strukturdynamik photoschaltbarer Moleküle mittels Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*, PhD thesis, 2010.
- [40] C. Slavov, H. Hartmann, and J. Wachtveitl, *Analytical Chemistry* **87**, 2328 (2015).
- [41] A. Tikhonov, *Doklady Akademi Nauk SSSR* **151**, 501 (1963).
- [42] G. Nagel et al., *Science* **296**, 2395 (2002).
- [43] R. A. Bogomolni and J. L. Spudich, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 6250 (1982).
- [44] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**, 2853 (1973).
- [45] D. Oesterhelt and W. Stoeckenius, *Nature New Biology* **233**, 149 (1971).
- [46] J. C. Venter et al., *Science* **304**, 66 (2004).
- [47] A. K. Sharma, O. Zhaxybayeva, R. T. Papke, and W. F. Doolittle, *Environmental Microbiology* **10**, 1039 (2008).
- [48] M. Martinez-Garcia et al., *The ISME Journal* **6**, 113 (2012).

- 
- [49] N. Atamna-Ismaeel et al., *The ISME Journal* **2**, 656 (2008).
- [50] E. Y. Koh et al., *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 5918 (2010).
- [51] L. C. Bohorquez, C. A. Ruiz-Perez, and M. M. Zambrano, *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 7813 (2012).
- [52] L. Petrovskaya et al., *FEBS Letters* **584**, 4193 (2010).
- [53] J. M. Walter, D. Greenfield, C. Bustamante, and J. Liphardt, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 2408 (2007).
- [54] A. Martinez, A. S. Bradley, J. R. Waldbauer, R. E. Summons, and E. F. DeLong, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 5590 (2007).
- [55] L. Gómez-Consarnau et al., *Nature* **445**, 210 (2007).
- [56] A. J. Hartz, B. F. Sherr, and E. B. Sherr, *Journal of Eukaryotic Microbiology* **58**, 171 (2011).
- [57] W.-W. Wang, O. A. Sineshchekov, E. N. Spudich, and J. L. Spudich, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 33985 (2003).
- [58] D. Man et al., *The EMBO Journal* **22**, 1725 (2003).
- [59] J. R. Hillebrecht et al., *Biochemistry* **45**, 1579 (2006).
- [60] T. Friedrich et al., *Journal of Molecular Biology* **321**, 821 (2002).
- [61] R. Rangarajan, J. F. Galan, G. Whited, and R. R. Birge, *Biochemistry* **46**, 12679 (2007).
- [62] A. L. Klyszejko et al., *Journal of Molecular Biology* **376**, 35 (2008).
- [63] S. Shastri et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 3012 (2007).
- [64] J. M. Kralj et al., *Biochemistry* **47**, 3447 (2008).
- [65] V. B. Bergo et al., *Journal of Biological Chemistry* **284**, 2836 (2009).
- [66] V. Bergo, J. J. Amsden, E. N. Spudich, J. L. Spudich, and K. J. Rothschild, *Biochemistry* **43**, 9075 (2004).

- 
- [67] A. K. Dioumaev et al., *Biochemistry* **41**, 5348 (2002).
- [68] Y. Furutani, D. Ikeda, M. Shibata, and H. Kandori, *Chemical Physics* **324**, 705 (2006).
- [69] D. Ikeda, Y. Furutani, and H. Kandori, *Biochemistry* **46**, 5365 (2007).
- [70] E. S. Imasheva, S. P. Balashov, J. M. Wang, A. K. Dioumaev, and J. K. Lanyi, *Biochemistry* **43**, 1648 (2004).
- [71] E. S. Imasheva et al., *Biochemistry* **44**, 10828 (2005).
- [72] G. Schäfer et al., *Photochemistry and Photobiology* **85**, 529 (2009).
- [73] F. Hempelmann et al., *Journal of the American Chemical Society* **133**, 4645 (2011).
- [74] M.-K. Verhoeven et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1807**, 1583 (2011).
- [75] J. Herz et al., *Biochemistry* **51**, 5589 (2012).
- [76] N. Pflieger, M. Lorch, A. C. Woerner, S. Shastri, and C. Glaubitz, *Journal of Biomolecular NMR* **40**, 15 (2008).
- [77] N. Pflieger et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1787**, 697 (2009).
- [78] L. Shi et al., *Journal of Molecular Biology* **386**, 1078 (2009).
- [79] M. Mehler et al., *Journal of Biological Chemistry* **290**, 27712 (2015).
- [80] M. Mehler et al., *Biophysical Journal* **105**, 385 (2013).
- [81] J. Mao et al., *Journal of the American Chemical Society* **136**, 17578 (2014).
- [82] J. Maciejko et al., *Journal of the American Chemical Society* **137**, 9032 (2015).
- [83] E. Bühl, M. Braun, A. Lakatos, C. Glaubitz, and J. Wachtveitl, *Biological Chemistry* **396**, 1109 (2015).
- [84] T. Ran et al., *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **69**, 1965 (2013).

- [85] S. Reckel et al., *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 11942 (2011).
- [86] H. Luecke, B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailler, and J. K. Lanyi, *Journal of Molecular Biology* **291**, 899 (1999).
- [87] R. A. Krebs, U. Alexiev, R. Partha, A. DeVita, and M. S. Braiman, *BMC Physiology* **2**, 5 (2002).
- [88] A. K. Dioumaev, J. M. Wang, and J. K. Lanyi, *Biochemistry* **42**, 6582 (2003).
- [89] V. Z. Spassov, H. Luecke, K. Gerwert, and D. Bashford, *Journal of Molecular Biology* **312**, 203 (2001).
- [90] S. P. Balashov et al., *Biophysical Journal* **74**, 293 (1998).
- [91] X. Ge and M. R. Gunner, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **84**, 639 (2016).
- [92] M. Lu et al., *Biochemistry* **39**, 2325 (2000).
- [93] R. Rammelsberg, G. Huhn, M. Lübben, and K. Gerwert, *Biochemistry* **37**, 5001 (1998).
- [94] S. Misra et al., *Biochemistry* **36**, 4875 (1997).
- [95] L. S. Brown et al., *Journal of Biological Chemistry* **270**, 27122 (1995).
- [96] C. Scharnagl, J. Hettenkofer, and S. F. Fischer, *International Journal of Quantum Chemistry* **52**, 33 (1994).
- [97] U. Haupts, J. Tittor, and D. Oesterhelt, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **28**, 367 (1999).
- [98] B. R. Kelemen, M. Du, and R. B. Jensen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1618**, 25 (2003).
- [99] J. Herz, *Untersuchung der primären Photodynamik von Proteorhodopsin mit spezifisch modifiziertem Protonenakzeptorkomplex*, Master thesis, 2010.
- [100] J. Tittor, U. Schweiger, D. Oesterhelt, and E. Bamberg, *Biophysical Journal* **67**, 1682 (1994).

- 
- [101] É. Lőrinczi et al., *Journal of Molecular Biology* **393**, 320 (2009).
- [102] J. Herbst, *Science* **297**, 822 (2002).
- [103] R. Diller et al., *Biopolymers* **82**, 358 (2006).
- [104] F. Peters, J. Herbst, J. Tittor, D. Oesterhelt, and R. Diller, *Chemical Physics* **323**, 109 (2006).
- [105] P. Hamm et al., *Chemical Physics Letters* **268**, 180 (1997).
- [106] M. O. Lenz et al., *Biophysical Journal* **91**, 255 (2006).
- [107] M. Lenz, A. Woerner, C. Glaubitz, and J. Wachtveitl, *Photochemistry and Photobiology* **83**, 226 (2007).
- [108] R. Huber et al., *Biochemistry* **44**, 1800 (2005).
- [109] J. J. Amsden et al., *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 11824 (2007).
- [110] A. Rupenyany et al., *Biophysical Journal* **94**, 4020 (2008).
- [111] M. K. Verhoefen, K. Neumann, I. Weber, C. Glaubitz, and J. Wachtveitl, *Photochemistry and Photobiology* **85**, 540 (2009).
- [112] K. Neumann, M.-K. Verhoefen, I. Weber, C. Glaubitz, and J. Wachtveitl, *Biophysical Journal* **94**, 4796 (2008).
- [113] G. Váró, L. S. Brown, M. Lakatos, and J. K. Lanyi, *Biophysical Journal* **84**, 1202 (2003).
- [114] M. Lakatos, J. K. Lanyi, J. Szakács, and G. Váró, *Biophysical Journal* **84**, 3252 (2003).
- [115] M. Lakatos and G. Váró, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **73**, 177 (2004).
- [116] F. Scholz, *Photozyklusstudien an mikrobiellen Retinalproteinen*, PhD thesis, 2013.
- [117] C. Roos et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1818**, 3098 (2012).

- [118] K. Mörs et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 1222 (2013).
- [119] J. Stehle et al., *Journal of Biomolecular NMR* **54**, 401 (2012).
- [120] C. Bamann, E. Bamberg, J. Wachtveitl, and C. Glaubitz, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**, 614 (2014).
- [121] I. H. M. Van Stokkum, D. S. Larsen, and R. Van Grondelle, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1657**, 82 (2004).
- [122] Y. Sharaabi, V. Brumfeld, and M. Sheves, *Biochemistry* **49**, 4457 (2010).
- [123] B. Xi et al., *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 2524 (2008).
- [124] C. E. Eckert, J. Kaur, C. Glaubitz, and J. Wachtveitl, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **8**, 512 (2017).
- [125] P. Hamm, *Chemical Physics* **200**, 415 (1995).
- [126] M. E. Heyde, D. Gill, R. G. Kilponen, and L. Rimai, *Journal of the American Chemical Society* **93**, 6776 (1971).
- [127] H. Kakitani, T. Kakitani, H. Rodman, B. Honig, and R. Callender, *The Journal of Physical Chemistry* **87**, 3620 (1983).
- [128] A. K. Dioumaev et al., *Biochemistry* **41**, 5348 (2002).
- [129] Y. Xiao, R. Partha, R. Krebs, and M. Braiman, *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 634 (2005).
- [130] S. P. Balashov, *Soviet Scientific Revisions D Physiochemical Biology* **8**, 1 (1988).
- [131] B. Hess and D. Kuschmitz, *FEBS Letters* **74**, 20 (1977).
- [132] K. Ohno, R. Govindjee, and T. Ebrey, *Biophysical Journal* **43**, 251 (1983).
- [133] L. Keszthelyi and P. Ormos, *FEBS Letters* **109**, 189 (1980).
- [134] Z. Dancsházy, L. Drachev, P. Ormos, K. Nagy, and V. Skulachev, *FEBS Letters* **96**, 59 (1978).

- 
- [135] S. B. Hwang, J. I. Korenbrot, and W. Stoeckenius, *BBA - Biomembranes* **509**, 300 (1978).
- [136] P. Ormos, Z. Dancsházy, and L. Keszthelyi, *Biophysical Journal* **31**, 207 (1980).
- [137] I. Grieger and G. H. Atkinson, *Biochemistry* **24**, 5660 (1985).
- [138] M. Stockburger, W. Klusmann, H. Gattermann, G. Massig, and R. Peters, *Biochemistry* **18**, 4886 (1979).
- [139] O. Kalisky, U. Lachish, and M. Ottolenghi, *Photochemistry and Photobiology* **28**, 261 (1978).
- [140] B. Hessling, J. Herbst, R. Rammelsberg, and K. Gerwert, *Biophysical Journal* **73**, 2071 (1997).
- [141] O. Kalisky, M. Ottolenghi, B. Honig, and R. Korenstein, *Biochemistry* **20**, 649 (1981).
- [142] S. P. Balashov, *Photobiochemistry Photobiophysics* **2**, 111 (1981).
- [143] S. P. Balashov, *Israel Journal of Chemistry* **35**, 415 (1995).
- [144] S. Druckmann et al., *Photochemistry and Photobiology* **56**, 1041 (1992).
- [145] N. Friedman, Y. Gat, M. Sheves, and M. Ottolenghi, *Biochemistry* **33**, 14758 (1994).
- [146] H. Takei, Y. Gat, M. Sheves, and A. Lewis, *Biophysical Journal* **63**, 1643 (1992).
- [147] A. Maeda et al., *Biochemistry* **39**, 10154 (2000).
- [148] S. Druckmann, M. Heyn, J. Lanyi, M. Ottolenghi, and L. Zimanyi, *Biophysical Journal* **65**, 1231 (1993).
- [149] A. N. Kriebel, T. Gillbro, and U. P. Wild, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **546**, 106 (1979).
- [150] P. Ormos, K. Chu, and J. Mourant, *Biochemistry* **31**, 6933 (1992).

- 
- [151] U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, and D. Oesterhelt, *Biochemistry* **36**, 2 (1997).
- [152] P. Hegemann, D. Oesterhelt, and E. Bamberg, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **819**, 195 (1985).
- [153] S. P. Balashov, M. Sumi, and N. Kamo, *Biophysical Journal* **78**, 3150 (2000).
- [154] C. Bamann, R. Gueta, S. Kleinlogel, G. Nagel, and E. Bamberg, *Biochemistry* **49**, 267 (2010).
- [155] H. Kakitani, T. Kakitani, H. Rodman, B. Honig, and R. Callender, *The Journal of Physical Chemistry* **87**, 3620 (1983).
- [156] J. Sawatzki, R. Fishcer, H. Scheer, and F. Siebert, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 5903 (1990).
- [157] M. Yamamoto, N. Hayakawa, M. Murakami, and T. Kouyama, *Journal of Molecular Biology* **393**, 559 (2009).
- [158] E. S. Lander et al., *Nature* **409**, 860 (2001).
- [159] O. Civelli et al., *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **53**, 127 (2013).
- [160] R. Fredriksson, *Molecular Pharmacology* **63**, 1256 (2003).
- [161] V. Y. Arshavsky, T. D. Lamb, and E. N. Pugh, *Annual Review of Physiology* **64**, 153 (2002).
- [162] J. Gutkind, *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1839 (1998).
- [163] H. E. Hamm, *Journal of Biological Chemistry* **273**, 669 (1998).
- [164] A. G. Gilman, *Annual Review of Biochemistry* **56**, 615 (1987).
- [165] D. Horton, A. Moran, A. Scrimgeour, G. Perry, and M. Rawn, *Principles of Biochemistry*, 2006.
- [166] N. Tuteja, *Plant Signaling & Behavior* **4**, 942 (2009).
- [167] K. Palczewski et al., *Science* **289**, 739 (2000).

- 
- [168] V. Cherezov et al., *Science* **318**, 1258 (2007).
- [169] T. Ebrey and Y. Koutalos, *Progress in Retinal and Eye Research* **20**, 49 (2001).
- [170] M. Murakami and T. Kouyama, *Nature* **453**, 363 (2008).
- [171] S. H. Park et al., *Nature* **491**, 779 (2012).
- [172] B. Zhang, D., Zhao, Q., Wu, *Molecules and Cells* **38**, 836 (2015).
- [173] P. Scheerer et al., *Nature* **455**, 497 (2008).
- [174] H.-W. Choe et al., *Nature* **471**, 651 (2011).
- [175] J. Standfuss et al., *Nature* **471**, 656 (2011).
- [176] X. Deupi et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 119 (2012).
- [177] S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* **469**, 175 (2011).
- [178] S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* **477**, 549 (2011).
- [179] G. Lebon et al., *Nature* **474**, 521 (2011).
- [180] F. Xu et al., *Science* **332**, 322 (2011).
- [181] J. F. White et al., *Nature* **490**, 508 (2012).
- [182] D. P. Hurst et al., *Journal of Biological Chemistry* **285**, 17954 (2010).
- [183] A. C. Kruse et al., *Nature* **482**, 552 (2012).
- [184] A. Manglik et al., *Nature* **485**, 321 (2012).
- [185] R. O. Dror et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 13118 (2011).
- [186] A. González, T. Perez-Acle, L. Pardo, and X. Deupi, *PLoS ONE* **6**, 23815 (2011).
- [187] H. Unal and S. S. Karnik, *Trends in Pharmacological Sciences* **33**, 79 (2012).
- [188] A. J. Venkatakrisnan et al., *Nature* **494**, 185 (2013).

- [189] S. Madabushi et al., *Journal of Biological Chemistry* **279**, 8126 (2004).
- [190] K. M. Schlinkmann et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 9810 (2012).
- [191] M. Congreve, C. J. Langmead, J. S. Mason, and F. H. Marshall, *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 4283 (2011).
- [192] V.-P. Jaakola et al., *Science* **322**, 1211 (2008).
- [193] C. D. Strader, T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood, and R. A. F. Dixon, *Annual Review of Biochemistry* **63**, 101 (1994).
- [194] V. Katritch, V. Cherezov, and R. C. Stevens, *Trends in Pharmacological Sciences* **33**, 17 (2012).
- [195] A. A. Thompson et al., *Nature* **485**, 395 (2012).
- [196] K. N. Nobles et al., *Cell Biology* **4**, 1 (2011).
- [197] S. J. Perry and R. J. Lefkowitz, *Trends in Cell Biology* **12**, 130 (2002).
- [198] A. Claing, S. Laporte, M. Caron, and R. J. Lefkowitz, *Progress in Neurobiology* **66**, 61 (2002).
- [199] J. Standfuss et al., *Nature* **471**, 656 (2011).
- [200] D. L. Farrens, C. Altenbach, K. Yang, W. L. Hubbell, and H. G. Khorana, *Science* **274**, 768 (1996).
- [201] S. P. Sheikh, T. A. Zvyaga, O. Lichtarge, T. P. Sakmar, and H. R. Bourne, *Nature* **383**, 347 (1996).
- [202] C. Altenbach, A. K. Kusnetzow, O. P. Ernst, K. P. Hofmann, and W. L. Hubbell, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 7439 (2008).
- [203] S. Ye et al., *Nature* **464**, 1386 (2010).
- [204] X. Deupi, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1837**, 674 (2014).
- [205] O. P. Ernst and F. J. Bartl, *ChemBioChem* **3**, 968 (2002).

- 
- [206] U. Müller, F., Kaupp, *Naturwissenschaften* **85**, 49 (1998).
- [207] K. D. Ridge and K. Palczewski, *Journal of Biological Chemistry* **282**, 9297 (2007).
- [208] M. E. Burns and V. Y. Arshavsky, *Neuron* **48**, 387 (2005).
- [209] U. Wilden, S. W. Hall, and H. Kuhn, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 1174 (1986).
- [210] H. Shichi and R. L. Somers, *Journal of Biological Chemistry* **253**, 7040 (1978).
- [211] K. Palczewski, J. H. McDowell, S. Jakes, T. S. Ingebritsen, and P. A. Hargrave, *Journal of Biological Chemistry* **264**, 15770 (1989).
- [212] Y. Ovchinnikov, *FEBS Letters* **148**, 179 (1982).
- [213] S. Wolf and S. Grünewald, *PloS ONE* **10**, e0123533 (2015).
- [214] P. A. Hargrave et al., *Biophysics of Structure and Mechanism* **9**, 235 (1983).
- [215] A. R. Oseroff and R. H. Callender, *Biochemistry* **13**, 4243 (1974).
- [216] T. P. Sakmar, R. R. Franke, and H. G. Khorana, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 8309 (1989).
- [217] J. Hwa, P. J. Reeves, J. Klein-Seetharaman, F. Davidson, and H. G. Khorana, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 1932 (1999).
- [218] S. S. Karnik, T. P. Sakmar, H. B. Chen, and H. G. Khorana, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 8459 (1988).
- [219] S. S. Karnik and H. G. Khorana, *Journal of Biological Chemistry* **265**, 17520 (1990).
- [220] R. Langen, K. Cai, C. Altenbach, H. Gobind Khorana, and W. L. Hubbell, *Biochemistry* **38**, 7918 (1999).
- [221] E. Getmanova et al., *Biochemistry* **43**, 1126 (2004).

- [222] C. Altenbach, K. Cai, H. G. Khorana, and W. L. Hubbell, *Biochemistry* **38**, 7931 (1999).
- [223] Mirzadegan, G. T., Benko, S. Filipek, and K. Palczewski, *Biochemistry* **42**, 2759 (2003).
- [224] T. D. Dunham and D. L. Farrens, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1683 (1999).
- [225] X. Periole, M. A. Ceruso, and E. L. Mehler, *Biochemistry* **43**, 6858 (2004).
- [226] T. Okada et al., *Journal of Molecular Biology* **342**, 571 (2004).
- [227] O. Fritze et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 2290 (2003).
- [228] J. F. Resek, Z. T. Farahbakhsh, W. L. Hubbell, and H. G. Khorana, *Biochemistry* **32**, 12025 (1993).
- [229] Z. Farahbakhsh, K. Hideg, and W. Hubbell, *Science* **262**, 1416 (1993).
- [230] Z. T. Farahbakhsh, K. D. Ridge, H. G. Khorana, and W. L. Hubbell, *Biochemistry* **34**, 8812 (1995).
- [231] E. Shi, W., Osawa, S., Dickerson, C.D., Weiss, *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2112 (1995).
- [232] R. Franke, B. Konig, T. Sakmar, H. Khorana, and K. Hofmann, *Science* **250**, 123 (1990).
- [233] H. Franke, R.R., Sakmar, T.P., Graham, R.M., Khorana, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14767 (1996).
- [234] B. Konig et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 6878 (1989).
- [235] R. Schoenlein, L. Peteanu, R. Mathies, and C. Shank, *Science* **254**, 412 (1991).
- [236] R. Kochendoerfer, G.G., Mathies, *Israel Journal of Chemistry* **35**, 211 (1995).

- 
- [237] C. Schnedermann, M. Liebel, and P. Kukura, *Journal of the American Chemical Society* **137**, 2886 (2015).
- [238] M. Liebel, C. Schnedermann, and P. Kukura, *Physical Review Letters* **112**, 198302 (2014).
- [239] P. J. M. Johnson et al., *Nature Chemistry* **7**, 980 (2015).
- [240] H. Khorana, *Journal of Biological Chemistry* **267**, 1 (1992).
- [241] T. P. Sakmar, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **59**, 1 (1998).
- [242] H. Matsumoto and T. Yoshizawa, *Nature* **258**, 523 (1975).
- [243] H. Dartnall, *Vision Research* **7**, 1 (1967).
- [244] T. Yoshizawa and G. Wald, *Nature* **197**, 1279 (1963).
- [245] E. C. Y. Yan et al., *Biochemistry* **43**, 10867 (2004).
- [246] R. S. Becker and K. Freedman, *Journal of the American Chemical Society* **107**, 1477 (1985).
- [247] Y. Koyama, K. Kubo, M. Komori, H. Yasuda, and Y. Mukai, *Photochemistry and Photobiology* **54**, 433 (1991).
- [248] H. Kandori, Y. Shichida, and T. Yoshizawa, *Biochemistry* **66**, 1197 (2001).
- [249] O. A. Smitienko et al., *Biochemistry (Moscow)* **75**, 25 (2010).
- [250] H. Kandori et al., *Biochemistry* **28**, 6460 (1989).
- [251] T. Mizukami et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 4072 (1993).
- [252] G. Haran, E. A. Morlino, J. Matthes, R. H. Callender, and R. M. Hochstrasser, *The Journal of Physical Chemistry A* **103**, 2202 (1999).
- [253] H. Kandori et al., *Journal of the American Chemical Society* **118**, 1002 (1996).
- [254] H. Nakamichi and T. Okada, *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 4270 (2006).

- [255] H. Nakamichi and T. Okada, *Angewandte Chemie* **118**, 4376 (2006).
- [256] L. M. Frutos, T. Andruniow, F. Santoro, N. Ferre, and M. Olivucci, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7764 (2007).
- [257] N. Kandori, H., Furutani, Y., Nishimura, S., Schichida, Y., Chosrowjan, H., Shibata, Y., Mataga, *Chemical Physics Letters* **334**, 271 (2001).
- [258] Q. Wang, R. Schoenlein, L. Peteanu, R. Mathies, and C. Shank, *Science* **266**, 422 (1994).
- [259] M. Taiji, K. Bryl, M. Nakagawa, M. Tsuda, and T. Kobayashi, *Photochemistry and Photobiology* **56**, 1003 (1992).
- [260] A. Gansmüller et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 1350 (2009).
- [261] R. S. H. Liu and L. U. Colmenares, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 14639 (2003).
- [262] M. Feldman, T. B., Smitienko, O.A., Shelaev, I.V., Gostev, F.E., Nekrasova, O.V., Dolgikh, D.A., Nadtochenko, V.A., Kirpichnikov, M.P., Ostrovsky, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **164**, 296 (2016).
- [263] M. Yan, L. Rothberg, and R. Callender, *The Journal of Physical Chemistry B* **105**, 856 (2001).
- [264] I. V. Shelaev et al., *Russian Journal of Physical Chemistry B* **8**, 510 (2014).
- [265] H. Nakamichi and T. Okada, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12729 (2006).
- [266] H. Kandori and A. Maeda, *Biochemistry* **34**, 14220 (1995).
- [267] T. Nagata et al., *Biochemistry* **36**, 6164 (1997).
- [268] J. Stehle et al., *Angewandte Chemie* **126**, 2110 (2014).
- [269] F. J. Bartl and R. Vogel, *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 1648 (2007).

- 
- [270] S. T. Menon, M. Han, and T. P. Sakmar, *Physiological Reviews* **81**, 1659 (2001).
- [271] A. Mendez et al., *Neuron* **28**, 153 (2000).
- [272] F. Jäger, K. Fahmy, T. P. Sakmar, and F. Siebert, *Biochemistry* **33**, 10878 (1994).
- [273] S. O. Smith et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 2055 (1984).
- [274] E. Ritter, M. Elgeti, and F. J. Bartl, *Photochemistry and Photobiology* **84**, 911 (2008).
- [275] M. Mahalingam and R. Vogel, *Biochemistry* **45**, 15624 (2006).
- [276] M. Heck, S. A. Schädel, D. Maretzki, and K. P. Hofmann, *Vision Research* **43**, 3003 (2003).
- [277] J. Lewis, F. van Kuijk, J. Carruthers, and D. Kliger, *Vision Research* **37**, 1 (1997).
- [278] R. G. Matthews, R. Hubbard, P. K. Brown, and G. Wald, *The Journal of General Physiology* **47**, 215 (1963).
- [279] K. Zimmermann, E. Ritter, F. J. Bartl, K. P. Hofmann, and M. Heck, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48112 (2004).
- [280] R. Vogel, F. Siebert, X. Y. Zhang, G. Fan, and M. Sheves, *Biochemistry* **43**, 9457 (2004).
- [281] K. J. Rothschild, J. Gillespie, and W. J. DeGrip, *Biophysical Journal* **51**, 345 (1987).
- [282] T. J. Melia, C. W. Cowan, J. K. Angleson, and T. G. Wensel, *Biophysical Journal* **73**, 3182 (1997).
- [283] R. Vogel and F. Siebert, *Journal of Biological Chemistry* **276**, 38487 (2001).
- [284] J. Liu, Y. Itagaki, S. Ben-Shabat, K. Nakanishi, and J. R. Sparrow, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 29354 (2000).

- [285] F. Haeseleer, J. Huang, L. Lebioda, J. C. Saari, and K. Palczewski, *Journal of Biological Chemistry* **273**, 21790 (1998).
- [286] R. O. Parker and R. K. Crouch, *Experimental Eye Research* **91**, 788 (2010).
- [287] A. H. Bunt-Milam and J. Saari, *The Journal of Cell Biology* **97**, 703 (1983).
- [288] Q. Wu et al., *Biochemistry* **46**, 8669 (2007).
- [289] T. I. Okajima, B. Wiggert, G. J. Chader, and D. R. Pepperberg, *Journal of Biological Chemistry* **269**, 21983 (1994).
- [290] J. C. Saari and D. L. Bredberg, *Journal of Biological Chemistry* **264**, 8636 (1989).
- [291] M. Jin, S. Li, W. N. Moghrabi, H. Sun, and G. H. Travis, *Cell* **122**, 449 (2005).
- [292] T. M. Redmond et al., *Nature Genetics* **20**, 344 (1998).
- [293] G. Moiseyev et al., *Biochemistry* **42**, 2229 (2003).
- [294] C. A. Driessen et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **36**, 1988 (1995).
- [295] P. Ala-Laurila et al., *The Journal of General Physiology* **128**, 153 (2006).
- [296] R. K. Crouch et al., *Photochemistry and Photobiology* **56**, 251 (1992).
- [297] V. V. Gurevich and E. V. Gurevich, *Pharmacology & Therapeutics* **110**, 465 (2006).
- [298] J. Granzin et al., *Nature* **391**, 918 (1998).
- [299] J. A. Hirsch, C. Schubert, V. V. Gurevich, and P. B. Sigler, *Cell* **97**, 257 (1999).
- [300] R. B. Sutton et al., *Journal of Molecular Biology* **354**, 1069 (2005).
- [301] M. Han, V. V. Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, P. B. Sigler, and C. Schubert, *Structure* **9**, 869 (2001).

- 
- [302] S. K. Milano, H. C. Pace, Y.-M. Kim, C. Brenner, and J. L. Benovic, *Biochemistry* **41**, 3321 (2002).
- [303] S. A. Vishnivetskiy, M. M. Hosey, J. L. Benovic, and V. V. Gurevich, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 1262 (2004).
- [304] M. Lohse, J. Benovic, J. Codina, M. Caron, and R. Lefkowitz, *Science* **248**, 1547 (1990).
- [305] H. Ohguro, R. S. Johnson, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, and K. Palczewski, *Biochemistry* **33**, 1023 (1994).
- [306] H. Ohguro, J. P. Van Hooser, A. H. Milam, and K. Palczewski, *Journal of Biological Chemistry* **270**, 14259 (1995).
- [307] V. V. Gurevich et al., *Journal of Biological Chemistry* **270**, 720 (1995).
- [308] J. Granzin, A. Stadler, A. Cousin, R. Schlesinger, and R. Batra-Safferling, *Scientific Reports* **5**, 15808 (2015).
- [309] S. A. Vishnivetskiy et al., *Journal of Biological Chemistry* **274**, 11451 (1999).
- [310] B. R. Aton, B. J. Litman, and M. L. Jackson, *Biochemistry* **23**, 1737 (1984).
- [311] J. H. McDowell, J. P. Nawrocki, and P. A. Hargrave, *Biochemistry* **32**, 4968 (1993).
- [312] S. M. Hanson et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 4900 (2006).
- [313] Y. Kang et al., *Nature* **523**, 561 (2015).
- [314] W. C. Smith et al., *Journal of Biological Chemistry* **269**, 15407 (1994).
- [315] K. Palczewski et al., *Protein Science* **3**, 314 (1994).
- [316] K. Schröder, A. Pulvermüller, and K. P. Hofmann, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43987 (2002).
- [317] Y. J. Kim et al., *Nature* **497**, 142 (2013).
- [318] J. Granzin et al., *Journal of Molecular Biology* **416**, 611 (2012).

- [319] S. E. Feuerstein et al., *Biochemistry* **48**, 10733 (2009).
- [320] D. Chatterjee et al., *Angewandte Chemie* **127**, 13759 (2015).
- [321] S. M. Hanson et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 3125 (2007).
- [322] K. S. Nair et al., *Neuron* **46**, 555 (2005).
- [323] X. E. Zhou, K. Melcher, and H. E. Xu, *Acta Pharmacologica Sinica* **33**, 291 (2012).
- [324] D. A. Baylor and M. E. Burns, *Eye* **12**, 521 (1998).
- [325] P. H. Tang, M. Kono, Y. Koutalos, Z. Ablonczy, and R. K. Crouch, *Progress in Retinal and Eye Research* **32**, 48 (2013).
- [326] J. R. Sparrow et al., *Vision Research* **43**, 2983 (2003).
- [327] R. A. Radu, N. L. Mata, A. Bagla, and G. H. Travis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 5928 (2004).
- [328] A. Wenzel, C. Grimm, M. Samardzija, and C. E. Remé, *Progress in Retinal and Eye Research* **24**, 275 (2005).
- [329] C. Chen et al., *Biophysical Journal* **88**, 2278 (2005).
- [330] M. E. Sommer, W. C. Smith, and D. L. Farrens, *Journal of Biological Chemistry* **280**, 6861 (2005).
- [331] K. Palczewski et al., *Biochemistry* **38**, 12012 (1999).
- [332] K. P. Hofmann, A. Pulvermüller, J. Buczyłko, P. Van Hooser, and K. Palczewski, *Journal of Biological Chemistry* **267**, 15701 (1992).
- [333] M. E. Sommer, K. P. Hofmann, and M. Heck, *Nature Communications* **3**, 1 (2012).
- [334] M. E. Sommer and D. L. Farrens, *Vision Research* **46**, 4532 (2006).
- [335] D. Chatterjee et al., *Angewandte Chemie International Edition* **54**, 13555 (2015).

- [336] D. Chatterjee, *Structural and Functional Characterization of Proteins: Bovine Visual Rhodopsin and PaMTH1, a SAM Dependent O-methyltransferase*, PhD thesis, 2016.
- [337] V. V. Gurevich, *Journal of Biological Chemistry* **273**, 15501 (1998).
- [338] P. J. Reeves, J.-M. Kim, and H. G. Khorana, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 13413 (2002).
- [339] P. J. Reeves, N. Callewaert, R. Contreras, and H. G. Khorana, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 13419 (2002).
- [340] J. Klein-Seetharaman et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 3452 (2002).
- [341] J. Klein-Seetharaman et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 3409 (2004).
- [342] T. Zhuang et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 942 (2013).
- [343] K. Werner et al., *Journal of Biomolecular NMR* **37**, 303 (2007).
- [344] K. Werner, C. Richter, J. Klein-Seetharaman, and H. Schwalbe, *Journal of Biomolecular NMR* **40**, 49 (2008).
- [345] O. Soubias and K. Gawrisch, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1818**, 234 (2012).
- [346] O. Soubias, W. E. Teague, K. G. Hines, and K. Gawrisch, *Biochimie* **107**, 28 (2014).
- [347] P. Humphries, P. Kenna, and G. Farrar, *Science* **256**, 804 (1992).
- [348] T. P. Dryja et al., *Nature* **343**, 364 (1990).
- [349] T. P. Dryja, E. L. Berson, V. R. Rao, and D. D. Oprian, *Nature Genetics* **4**, 280 (1993).
- [350] C. H. Sung, B. G. Schneider, N. Agarwal, D. S. Papermaster, and J. Nathans, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 8840 (1991).

- 
- [351] M. J. Smit et al., *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **47**, 53 (2007).
- [352] C. H. Sung et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 6481 (1991).
- [353] D. A. Baylor, B. Nunn, and J. Schnapf, *Journal of Physiology* **357**, 575 (1984).
- [354] H. Tian, T. P. Sakmar, and T. Huber, *Biophysical Journal* **112**, 153 (2017).
- [355] A. M. Dizhoor et al., *Journal of Neuroscience* **28**, 11662 (2008).
- [356] D. Rao, V.R., Cohen, G.B., Oprian, *Nature* **367**, 639 (1994).
- [357] M. I. Naash et al., *The Journal of Comparative Neurology* **478**, 149 (2004).
- [358] P. R. Robinson, G. B. Cohen, E. A. Zhukovsky, and D. D. Oprian, *Neuron* **9**, 719 (1992).
- [359] G. B. Cohen, T. Yang, P. R. Robinson, and D. D. Oprian, *Biochemistry* **32**, 6111 (1993).
- [360] G. Xie, A. K. Gross, and D. D. Oprian, *Biochemistry* **42**, 1995 (2003).
- [361] J. Standfuss et al., *Journal of Molecular Biology* **372**, 1179 (2007).
- [362] S. Maeda et al., *PLoS ONE* **9**, e98714 (2014).
- [363] J. M. Janz and D. L. Farrens, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 55886 (2004).
- [364] A. K. Gross, V. R. Rao, and D. D. Oprian, *Biochemistry* **42**, 2009 (2003).
- [365] S. Jin, M. C. Cornwall, and D. D. Oprian, *Nature Neuroscience* **6**, 731 (2003).
- [366] P. A. Sieving et al., *The Journal of Neuroscience* **21**, 5449 (2001).
- [367] V. R. Rao, G. B. Cohen, and D. D. Oprian, *Nature* **367**, 639 (1994).

- 
- [368] J. Neidhardt, D. Barthelmes, F. Farahmand, J. C. Fleischhauer, and W. Berger, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **47**, 1630 (2006).
- [369] A. Singhal et al., *EMBO Reports* **14**, 520 (2013).
- [370] E. Zhukovsky and D. Oprian, *Science* **246**, 928 (1989).
- [371] J.-M. Kim et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 12508 (2004).
- [372] A. K. Gross, G. Xie, and D. D. Oprian, *Biochemistry* **42**, 2002 (2003).
- [373] T. A. Zvyaga, K. Fahmy, F. Siebert, and T. P. Sakmar, *Biochemistry* **35**, 7536 (1996).
- [374] K. Fahmy, T. A. Zvyaga, T. P. Sakmar, and F. Siebert, *Biochemistry* **35**, 15065 (1996).
- [375] G. V. Nikiforovich and G. R. Marshall, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**, 430 (2006).
- [376] S. Kawamura, A. T. Colozo, L. Ge, D. J. Muller, and P. S.-H. Park, *Journal of Biological Chemistry* **287**, 21826 (2012).
- [377] D. Toledo et al., *Journal of Biological Chemistry* **286**, 39993 (2011).
- [378] S. Jäger et al., *Biochemistry* **36**, 1999 (1997).
- [379] F. Siebert and W. Mäntele, *Biophysics of Structure and Mechanism* **6**, 147 (1980).
- [380] I. Palings, E. M. M. Van den Berg, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies, *Biochemistry* **28**, 1498 (1989).
- [381] G. Eyring, B. Curry, A. Broek, J. Lugtenburg, and R. A. Mathies, *Biochemistry* **21**, 384 (1982).



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Menschen bedanken, die mir auf verschiedenste Art und Weisen während der Arbeit an meiner Dissertation geholfen haben.

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. Josef Wachtveitl zunächst für das Ermöglichen und die Betreuung dieser Dissertation danken. Er schenkte mir großes Vertrauen in all meinen wissenschaftlichen Tätigkeiten. Obwohl er viel beschäftigt war (und ist), nahm er sich stets Zeit für mich. Er unterstützte mich wo er konnte und gab mir viele wertvolle Ratschläge, die nicht ausnahmslos wissenschaftlicher Natur waren. Außerdem danke ich ihm für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, zu der er durch seine freundliche, vertrauensvolle und soziale Art wesentlich beiträgt.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Clemens Glaubitz und Prof. Dr. Mike Heilemann als meine Mentoren. Sie waren stets sehr interessiert an meinen Forschungsergebnissen und gaben mir Feedback, wofür ich sehr dankbar bin.

Außerdem bin ich PD Dr. Markus Braun sehr dankbar. Er nahm sich stets Zeit, mit mir wissenschaftliche Fragestellungen zu diskutieren und Lösungen sowohl für technische als auch experimentelle Probleme zu finden. Die Zusammenarbeit mit ihm war immer sehr angenehm, unkompliziert und vor allem unterhaltsam.

Danke an Prof. Dr. Clemens Glaubitz, Prof. Dr. Harald Schwalbe, Dr. Jagdeep Kaur, Dr. Deep Chatterjee, Dr. Michaela Mehler, Nina Kubatova und Dr. Krishna Saxena für die hervorragende und stets sehr angenehme Zusammenarbeit an zahlreichen Projekten und selbstverständlich für die Bereitstellung der Proben. Besonderer Dank gilt hier Dr. Deep Chatterjee, mit dem ich eine sehr gute, produktive und nicht zuletzt lustige Zusammenarbeit sowohl

am Schreibtisch als auch im Labor erleben durfte.

Für das Korrekturlesen und die Hilfe beim Feinschliff dieser Arbeit, möchte ich mich bei PD Dr. Markus Braun, Nina Kubatova und Prof. Franz-Joachim Eckert bedanken.

Thomas Köhler, Peter Eberhardt, Chokri Boumrifak, Elena Bühl, David Urmann, Dinh Du Tran, Henrik Gustmann, Dr. Chavdar Slavov und weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wachtveitl möchte ich für ihre Hilfe durch wissenschaftliche Gespräche danken. Sie brachten mich auf viele wertvolle Ideen, die mir zum Fortschritt meiner Projekte verhalfen. Außerdem waren gemeinsame Einsätze mit Kollegen in den Laboren von großem Wert für mich. Besonderer Dank gilt hier Felix Schweighöfer, Dr. Lars Dworak und Dr. Sabrina Steinwand.

Danke an die gesamte Arbeitsgruppe Wachtveitl für die stets angenehme und hilfsbereite Zusammenarbeit, die unterhaltsamen Mittagspausen und die vielen spaßigen Events abseits der Universität.

Meinen Bürogenossen möchte ich für die unkomplizierte und spaßige Atmosphäre danken. Danke für das Dulden meines dreckigen Fahrrads, der vielen Handtücher, der komplex wirkenden Gestaltung meines Schreibtisches, der 20 Paar Schuhe unter meinem Tisch und meiner nicht durchgehend stringent-seriösen Art.

Außerdem möchte ich einen großen Dank an Kirstin Grönitz und Angelika Kopka für ihr großes Engagement und ihre stets präsente Hilfsbereitschaft aussprechen. Ohne sie wäre vieles in Chaos versunken.

Jochen Feldhaar und dem Team der Feinmechanikwerkstatt verdanke ich es, dass viele unserer experimentellen Ideen und Wünsche auch umgesetzt werden konnten. Vielen Dank für die stetige Hilfsbereitschaft und das große Engagement.

Danken möchte ich außerdem einigen Freunden, Studienkollegen und Weggefährten, die mir halfen, mich von den phasenweise frustrierenden Zeiten abzulenken. Dies gilt besonders für Elisabeth Trillig, Dr. Nicolas Sommer, Dr. Robert Ricker, Dr. Igor Pugliesi, Dr. Nils Krebs, Dr. Max Bradler, Thomas Weissgerber, Antje Kochendörfer, Martin, Hannah, Jonah und Magnus Kozacki, Paul Mrozek und Benjamin Marx.

Viele weitere Menschen schenken und schenken mir immer wieder Kraft,

befreiende und wunderbare Gedanken und zeigen mir auf ihre individuelle Art und Weisen, Sinngebendes zu erkennen. Die meisten dieser Menschen durfte ich leider nie kennenlernen. Die Wichtigsten unter ihnen sind Ernst Bloch, Erich Fromm, Hans Küng, Blaise Pascal, Baruch de Spinoza, Michel Petrucciani, Harry James Angus, Ollie McGill, Abdullah Ibrahim, Allen Toussaint und Esbjörn Svensson.

Ein unbeschreiblich großer Dank gilt meiner Familie: Rike, mein kleiner, noch reisender Sohn, Gilla, Jonas, Jana, Julian, Holger, Verena, Johanna, Marla, Eri, Katrin, Werner, Gesine, Meike, Mathias, Thorsten und Finneas. Es ist so schön, dass ich Euch habe. Danke für Eure unglaublich große Liebe, Euer Lachen, Euer Dasein.

Speziell meinen Eltern habe ich im Grunde alles zu verdanken. Ihre selbstlose, permanente Unterstützung seit ich denken kann und ihre bedingungslose Liebe sind mir von unschätzbarem Wert. Groß ist der Schatz, den ihr mir geschenkt habt. Vielen Dank, dass ich Euch habe.

Meiner geliebten Frau Rike möchte ich danken, dass ich sie an meiner Seite haben darf. Ihre große Liebe, ihr Frohsinn, ihre Geduld und ihre Unterstützung in allen Belangen sind ein kostbares, unverzichtbar gewordenes Geschenk für mich. Danke dafür!

Zu guter Letzt möchte ich einem Menschen danken, den ich bisher nur über Klopfzeichen kennenlernen durfte. Er ist noch einige Tage verdeckt auf dunkler Bildungsreise. Dennoch gelingt es diesem kleinen Mann, mir bereits jetzt beispiellose Motivation und Inspiration zu schenken und konzeptionelles, befreiendes Umdenken in mir anzustoßen.



# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Die Versicherung bezieht sich auch auf in der Arbeit gelieferte Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Persönliche Daten

Name Carl Elias Eckert  
Geburtstag 12.02.1985  
Geburtsort Darmstadt, Deutschland



Seit 04/2013 **Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main**  
[www.theochem.uni-frankfurt.de/femtochem](http://www.theochem.uni-frankfurt.de/femtochem)  
Doktorand am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie im Arbeitskreis Wachtveitl

02/2012 – 02/2013 **Ludwig-Maximilians-Universität München**  
[www.uni-muenchen.de](http://www.uni-muenchen.de)  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Physik-Institut für Biomolekulare Optik (BMO) im Arbeitskreis Riedle

10/2009 – 10/2011 **Philipps-Universität Marburg**  
[www.uni-marburg.de](http://www.uni-marburg.de)  
Abschluss des Physikstudiums (M. Sc.), Master-Thesis: "Fundamental Investigations for the Realization of a Kerr-Lens mode-locked semiconductor disk laser"

10/2008 – 06/2009 **Università Degli Studi di Milano, Italien**  
[www.unimi.it](http://www.unimi.it)  
Beginn des Physikstudiums (M. Sc.)

10/2006 – 10/2008 **Philipps-Universität Marburg**  
[www.uni-marburg.de](http://www.uni-marburg.de)  
Abschluss des Physikstudiums (B. Sc.)

10/2005 – 09/2006 **Technische Universität Darmstadt**  
[www.tu-darmstadt.de](http://www.tu-darmstadt.de)  
Beginn des Physikstudiums (B. Sc.)

09/1995 – 06/2004 **Edith-Stein-Schule, Darmstadt**  
Abitur