

**Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen  
zur Aufklärung der Photoreaktionen  
mikrobieller Rhodopsine**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von

**Elena Bühl**

geb. Pepler

aus Circik

Frankfurt 2017

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Gothe Universität als Dissertation angenommen

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

Datum der Disputation

*Für meine Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

1	Motivation .....	1
2	Theoretischer Hintergrund.....	5
2.1	Grundlagen optischer Spektroskopie .....	5
2.1.1	Absorptionsspektroskopie im UV/vis-Bereich .....	6
2.1.2	Absorptionsspektroskopie im IR-Bereich.....	7
2.1.3	Relaxationsprozesse .....	9
2.2	Nichtlineare Effekte .....	12
2.2.1	Phasenanpassung.....	13
2.2.2	Optisch-parametrische Verstärkung .....	15
2.2.3	Gruppengeschwindigkeitsdispersion .....	15
2.2.4	Erzeugung ultrakurzer Laserpulse.....	16
3	Experimenteller Aufbau.....	19
3.1	Anreg-Abtast-Spektroskopie.....	19
3.1.1	Laserquelle .....	20
3.1.2	Erzeugung von Anregungspulsen.....	22
3.1.3	Aufbau des <i>pump-probe</i> -Experiments im UV/vis-Bereich.....	24
3.1.4	Der UV/vis- <i>pump</i> -IR- <i>probe</i> -Aufbau .....	25
3.1.5	Datenauswertung.....	27
3.2	Das Blitzlichtphotolyse-Experiment .....	29
3.2.1	Nd:YAG-Laser .....	29
3.2.2	Experimenteller Aufbau .....	30
4	Channelrhodopsin-2.....	34
4.1	Einleitung.....	34
4.2	Kurzzeit-IR-Spektroskopie im Bereich der Carbonylschwingungen der Proteinseitenketten.....	40

4.2.1	Probenpräparation und Experimentelles .....	41
4.2.2	Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen im IR-Bereich.. .....	42
4.2.3	Bandenzuordnung.....	44
4.2.4	Diskussion .....	47
4.3	Einfluss des Arg-120 auf den Photozyklus, die Retinalisomerisierung und die Kanalfunktion.....	51
4.3.1	Probenpräparation und Experimentelles .....	52
4.3.2	Stationäre Charakterisierung.....	53
4.3.3	Ultrakurzzeitspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich .....	54
4.3.4	Untersuchung des Photozyklus mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse..	57
4.3.5	Ultrakurzzeitspektroskopie im IR-Bereich.....	58
4.3.6	Diskussion .....	62
4.4	Spektroskopische Untersuchungen an ChR-2 mit einem „geblockten“ Retinal.....	69
4.4.1	Probenpräparation und Experimentelles .....	70
4.4.2	Stationäre Charakterisierung.....	71
4.4.3	Ergebnisse der <i>pump/probe</i> -Experimente im UV/vis-Bereich.....	72
4.4.4	Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse-Experimente .....	75
4.4.5	Diskussion .....	77
5	Proteorhodopsin.....	86
5.1	Einleitung .....	86
5.2	Fluoreszenz und Primärreaktion des Retinals mit deprotonierter Schiff- Base 91	
5.2.1	Probenpräparation und Experimentelles .....	91
5.2.2	Stationäre Charakterisierung.....	93
5.2.3	Primärreaktion des Retinals mit deprotonierter Schiff-Base .....	94
5.2.4	Diskussion .....	98
6	Zusammenfassung .....	102

7	Literatur .....	108
8	Anhang.....	124
9	Danksagung.....	126
	Eidesstattliche Erklärung.....	128
	Publikationen und Konferenzbeiträge.....	130





# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung möglicher Relaxationsprozesse nach elektronischer Anregung in einem Jablonski-Diagramm. ....	10
Abbildung 2: Kollineare und nicht kollineare Anordnung für optisch-parametrische Verstärkung. ....	15
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines pump-probe-Experiments. ....	20
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines CPA. ....	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines NOPA-Aufbaus. ....	23
Abbildung 6: Aufbau des UV/vis-pump-UV/vis-probe-Experiments. ....	25
Abbildung 7: Schematischer Aufbau ultrakurzer Laserpulse im mittleren Infrarotbereich mit zweistufigem OPA und Differenzfrequenzbildung. ....	26
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Blitzlichtphotolyse-Experiments. ....	32
Abbildung 9: (A) Schematische Darstellung des Photozyklus von ChR-2. (B) Darstellung der Retinalumgebung, basierend auf der Kristallstruktur der C1C2-Chimäre. ....	36
Abbildung 10: Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 nach Photoanregung bei 480 nm. ....	42
Abbildung 11: A) Amplitudenspektren der globalen Fit-Analyse von ChR-2. B) Transiente Absorptionsspektren von ChR-2 (Fit) zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,4 ps und 1,8 ns. C) Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 zu ausgewählten Wellenzahlen. ....	43
Abbildung 12: A) Absorptionsänderung nach einer Verzögerungszeit von 1,8 ns und seine zweite Ableitung. B) Absorptionsänderung nach einer Verzögerungszeit von 1,8 ns (rot) mit 11 angepassten Gauß-Funktionen. ....	45
Abbildung 13: A) TEVC-Aufnahme der R120H-Mutante. B) Transportaktivität der R120H-Mutante verglichen mit dem Wildtyp von ChR-2. ....	51
Abbildung 14: Statische Absorptionsspektren der R120H-Mutante und des Wildtyps von ChR-2 und ihre 2. Ableitungen. ....	54
Abbildung 15: Transientes Absorptionsspektrum der R120H-Mutante von ChR-2 nach einer Anregung bei 480 nm. ....	55

Abbildung 16: A) Transiente Absorptionsspektren (TSP) von R120H nach der Fit-Analyse zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,2 ps und 1,5 ns. B) Zerfallsassoziierte Spektren (DAS) der Zeitkonstanten $\tau_2$ , $\tau_3$ und $\tau_4$ von R120H. C) Einzeltransienten der R120H-Mutante (schwarz) und des Wildtyps (grau) von ChR-2 zu ausgewählten Abtastwellenlängen.....	56
Abbildung 17: Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse-Experimente an der R120H-Mutante (A) und dem Wildtyp von ChR-2 (B), dargestellt als Farbplot. C) Die Amplitudenspektren von R120H der durch die globale Fitanalyse gewonnenen Zeitkonstanten. D) Einzeltransienten der R120H-Mutante und des Wildtyps von ChR-2 zu ausgewählten Wellenlängen.....	58
Abbildung 18: Transiente Absorptionsspektren des Wildtyps und der R120H-Mutante im IR-Bereich nach der globalen Fit-Analyse ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps.....	59
Abbildung 19: Einzeltransienten der R120H-Mutante und des Wildtyps von ChR-2 zu ausgewählten Wellenzahlen im Bereich der Retinalschwingungsbanden (A) und im Spektralbereich der Proteinmoden (B). C) Die Amplitudenspektren von R120H nach der globalen Fit-Analyse. D) Die Absorptionsspektren nach einer Verzögerungszeit von 1,5 ns (DAS von $\tau_4$ ) des Wildtyps und der R120H-Mutante von ChR-2.....	61
Abbildung 20: Transiente Absorptionsänderung bei 526 nm des Wildtyps bei pH-Werten von 7,4 und 4 sowie der Mutanten D253N, E123T und R120H.....	63
Abbildung 21: Transiente Absorptionsspektren des Wildtyps sowie der Mutanten E123T, R120H und D253N von ChR-2 nach der globalen Fit-Analyse ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps.....	65
Abbildung 22: Einzeltransienten im Bereich der Amid I-Schwingungsbande sowie die Zeitschnitte zwischen 0,4 ps und 1,8 ns des Wildtyps und der Mutanten R120H, E123T und D253N von ChR-2.....	66
Abbildung 23: IR-Spektren von Guanidinhydrochlorid in D <sub>2</sub> O (A) und H <sub>2</sub> O (B) bei pH-Werten 8 und 13 sowie die daraus resultierenden Differenzspektren (C-D).....	67

Abbildung 24: (A) Strukturformeln des all-trans- und 13-cis-Isomers des 9,12-Phenylretinals. (B) Das Amplitudenverhältnis der Photoströme von ChR-2 vor und nach der Rekonstitution mit PheRet und ATR.....	70
Abbildung 25: Stationäres Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von 9,12-Phenylretinal in ChR-2.....	72
Abbildung 26: Transientes Absorptionsspektrum von mit 9,12-Phenylretinal rekonstituiertem ChR-2 nach einer Anregung bei 387 nm.....	73
Abbildung 27: (A) Zerfallsassoziierte Spektren der durch die globale Fitanalyse erhaltenen Zeitkonstanten von ChR-2 mit PheRet. (B) Zeitschnitte (Fits) von PheRet in ChR-2 zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,1 ps und 1,5 ns. (C) Einzeltransienten zu ausgewählten Wellenlängen von PheRet in ChR-2.....	74
Abbildung 28: Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse-Experimente an ChR-2 mit PheRet (A) und ATR (B) als Chromophor. C) Die Amplitudenspektren von PheRet in ChR-2 der durch die globale Fitanalyse gewonnenen Zeitkonstanten. D) Einzeltransienten von ChR-2 mit PheRet und ATR zu ausgewählten Wellenlängen.....	76
Abbildung 29: Das Ergebnis der Simulation des pump-probe-Datensatzes von ChR-2 mit PheRet als Chromophor.....	81
Abbildung 30: Einzeltransienten von PheRet in ChR-2 bei 451 nm und 511 nm sowie die Differenz aus den beiden Transienten.....	82
Abbildung 31: Reaktionsmodell der Primärreaktion von 9,12-Phenylretinal in ChR-2 nach einer Anregung bei 387 nm.....	83
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Photozyklen des all-trans-Retinals und des 9,12-Phenylretinals in ChR-2.....	85
Abbildung 33: Struktur des grünabsorbierenden Proteorhodopsins sowie die schematische Darstellung seines Photozyklus bei einem pH-Wert von 9.....	89
Abbildung 34: Absorptionsspektren von GPR bei pH-Werten von 9 (A) und 5 (B) sowie Fluoreszenzspektren nach einer Anregung im Hauptabsorptionsmaximum und bei 360 nm. (C-D) Wellenlängenabhängige	

Fluoreszenzspektren vom grünabsorbierendem Proteorhodopsin bei zwei verschiedenen pH-Werten. ....	94
Abbildung 35: Transiente Absorptionsspektren von GPR bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 520 nm (A) und 360 nm (C) sowie bei einem pH-Wert von 5 nach einer Anregung bei 540 nm (B) und 360 nm (D). ....	96
Abbildung 36: Zeitschnitte von GPR bei einem pH-Wert von 9 zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,1 ps und 1 ns nach einer Anregung bei 360 nm (A) und 520 nm (B). Amplitudenspektren der Zeitkonstanten nach der globalen Fit-Analyse von GPR bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 360 nm (C) und 520 nm (D). ....	97
Abbildung 37: Einzeltransienten zu ausgewählten Wellenlängen von GPR bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 360 nm (A) und 520 (nm). ....	98
Abbildung 38: Reaktionsmodell der Isomerisierungsreaktion des Retinals mit deprotonierter (dSBR) und protonierter Schiff-Base (pSBR) des GPR nach einer Anregung bei 360 nm. ....	101

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AgGaS<sub>2</sub></b>	Silberthiogallat
<b>AOM</b>	Akusto-optischer Modulator
<b>ASR</b>	<i>Anabena Sensory Rhodopsin</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>ATR</b>	all- <i>trans</i> -Retinal
<b>BBO</b>	β-Bariumborat
<b>BPR</b>	Blauabsorbierendes Proteorhodopsin
<b>BR</b>	Bacteriorhodopsin
<b>BS</b>	<i>Beam Splitter</i>
<b>CaF<sub>2</sub></b>	Calciumfluorid
<b>ChR-2</b>	Channelrhodopsin-2
<b>CI</b>	<i>Conical Intersection</i>
<b>CPA</b>	<i>Chirped Pulse Amplification</i>
<b>DAS</b>	<i>Decay Associated Spectra</i>
<b>DFG</b>	<i>Difference Frequency Generation</i>
<b>DM</b>	<i>Dichroic Mirror</i>
<b>DM</b>	<i>n-Decyl-β-D-Maltopyranosid</i>
<b>DDM</b>	<i>n-Dodecyl-β-D-Maltosid</i>
<b>ESA</b>	<i>Excited State Absorption</i>
<b>FM</b>	<i>Flip Mirror</i>
<b>FTIR</b>	<i>Fourier-Transform-Infrared</i>
<b>FWHM</b>	<i>Full Width at Half Maximum</i>
<b>GPCR</b>	<i>G Protein-Coupled Receptor</i>
<b>GPR</b>	Grünabsorbierendes Proteorhodopsin
<b>GSB</b>	<i>Ground State Bleaching</i>
<b>GuaHCl</b>	Guanidinhydrochlorid
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HKR</b>	Histidin-Kinase-Rhodopsin
<b>HOMO</b>	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>

<b>HR</b>	Halorhodopsin
<b>IC</b>	<i>Internal Conversion</i>
<b>ICCD</b>	<i>Intensified Charge-Coupled Device</i>
<b>InGaAs</b>	Indium-Galium-Arsenit
<b>IR</b>	Infrarot
<b>ISC</b>	<i>Intersystem Crossing</i>
<b>IVR</b>	<i>Internal Vibrational Energy Redistribution</i>
<b>KTP</b>	Kaliumtitanylphosphat
<b>LBO</b>	Lithiumtriborat
<b>LUMO</b>	<i>Lowest Occupied Molecular Orbital</i>
<b>MCT</b>	<i>Mercury Cadmium Telluride</i>
<b>MD</b>	<i>Molecular Dynamics</i>
<b>Nd:YAG</b>	Neodym dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>NOPA</b>	<i>Non-collinear Optical Parametric Amplifier</i>
<b>OPA</b>	<i>Optical Parametric Amplification</i>
<b>OPO</b>	Optisch-parametrischer Oszillator
<b>PA</b>	<i>Product Absorption</i>
<b>PFID</b>	<i>Perturbed Free Induction Decay</i>
<b>PheRet</b>	9,12-Phenylretinal
<b>PPLN</b>	<i>Periodically Poled Lithium Niobate</i>
<b>PR</b>	Proteorhodopsin
<b>QM/MM</b>	<i>Quantum Mechanics/Molecular Mechanics</i>
<b>SE</b>	<i>Stimulated Emission</i>
<b>SFG</b>	<i>Sum Frequency Generation</i>
<b>SHG</b>	<i>Second Harmonic Generation</i>
<b>SM</b>	<i>Spherical Mirror</i>
<b>SR</b>	Sensorrhodopsin
<b>THG</b>	<i>Third Harmonic Generation</i>
<b>Ti:Sa</b>	Titan-Saphir
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

<b>TSP</b>	<i>Transient Spectra</i>
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>Vis</b>	<i>visible</i>
<b>wt</b>	<i>wild type</i>





# 1 Motivation

Die Nutzung des Sonnenlichts als Energiequelle ist für Organismen in allen drei Domänen des Lebens von essentieller Bedeutung. Im Laufe der Evolution entwickelten Lebewesen hierzu komplexe Mechanismen der Phototransduktion, an denen zahlreiche Rezeptorproteine beteiligt sind. Ein gemeinsames Merkmal aller Photorezeptoren ist das Vorhandensein eines Chromophormoleküls innerhalb des Photorezeptorproteins. Die Aufnahme eines Photons führt dabei zu elektronischer Anregung und einer anschließenden strukturellen Änderung des Chromophors, was wiederum Konformationsänderungen des gesamten Photorezeptorproteins initiiert. Zu den am häufigsten vorkommenden Photorezeptorfamilien gehören Cryptochrome, Phototropine und BLUF Proteine sowie Phytochrome, Xanthopsine und Rhodopsine. Während die ersten drei Familien verschiedene Flavine als Chromophor aufweisen, basiert die Funktionsweise der letzteren auf der Isomerisierungsreaktion der Chromophore wie Phytochromobilin, p-Cumarinsäure oder Retinal.[1]

Gegenstand dieser Arbeit sind Retinalproteine, auch Rhodopsine genannt. Diese Photorezeptoren sind lichtaktive Proteine in den photosensorischen Systemen prokaryotischer und eukaryotischer Organismen. Sie bestehen aus einem Opsin-Gerüst aus sieben Transmembranhelices und einem kovalent gebundenen Vitamin-A-Aldehyd (Retinal) als Chromophor. Aufgrund der Sequenzhomologien werden Retinalproteine in Typ I- und Typ II-Rhodopsine unterschieden. Die Typ II-Rhodopsine sind G-Protein-gekoppelte Photorezeptoren (GPCR<sup>1</sup>), die sich in lichtempfindlichen Sinnesorganen, wie z.B. Zapfen und Stäbchen des Auges, der *Vertebrata* (Wirbeltiere) und *Invertebrata* (Wirbellose) befinden und höheren Eukaryoten die visuelle Wahrnehmung ermöglichen. Das Retinal liegt im nicht angeregten Zustand in einer 11-*cis*-Konformation vor und isomerisiert nach Belichtung in seine all-*trans*-Form. Die Isomerisierung des Chromophors führt zu Konformationsänderungen des

---

<sup>1</sup> G Protein-Coupled Receptor (eng.)

Photorezeptors und zur Aktivierung des G-Proteins Transducin, was anschließend in einer visuellen Signalübermittlung resultiert.[2–5] Zu der Klasse der Typ I-Rhodopsine gehören mikrobielle Rhodopsine, bei denen das Retinal im nicht angeregten Zustand in einer *all-trans*-Konformation vorliegt und nach Photoanregung in die *13-cis*-Form isomerisiert.[6]

Die ersten Vertreter der mikrobiellen Rhodopsine wurden in den Archaeen *Halobacterium Salinarum* entdeckt.[7] Dazu zählen die auswärtsgerichtete Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR), die Chloridpumpe Halorhodopsin (HR) sowie die Sensorproteine Sensorrhodopsin I und II (SRI, SR II).[8–12] Bacteriorhodopsin zählt bis heute zu den am besten erforschten Transmembran-proteinen und dient seit seiner Entdeckung als hervorragendes Modellsystem für mikrobielle Rhodopsine.[13] Als lichtgetriebene Protonenpumpe baut BR einen Protonengradienten über die Zellmembran auf, der von der  $F_0F_1$ -ATPase zur  $ATP^{2-}$ -Produktion genutzt wird,[14] und ist somit an der so genannten „halophilen“ Photosynthese der Archaeen beteiligt. Die Generierung des Membranpotentials durch Protonenpumpen wie BR ist zwar nicht so effektiv wie durch das Reaktionszentrum der Purpurbakterien oder durch das Photosystem höherer Pflanzen, doch ihr einfacher Aufbau führte letztendlich zu einer weiten Verbreiterung dieser Proteine in verschiedenen Mikroorganismen.[15] So konnte im Jahr 2000 das erste bakterielle Retinalprotein, Proteorhodopsin (PR), in der Monterey Bay in Kalifornien entdeckt werden.[16,17] Ähnlich wie BR fungiert Proteorhodopsin als lichtgetriebene Protonenpumpe und dient somit der Energiegewinnung der Zelle.[18,19]

Neben den retinalbasierten Protonenpumpen war die Entdeckung der Ionenkanäle Channelrhodopsin-1 und -2 im Augenfleck der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* von enormer Bedeutung.[20–23] Die Besonderheit stellt dabei die Funktion der Proteine dar, nach Lichtaktivierung Ionen über die Zellmembran der Alge zu leiten. Durch die so ausgelöste Membrandepolarisation kontrollieren die Channelrhodopsine je nach

---

<sup>2</sup> Adenosinriphosphat

Lichtintensität die Flagellenbewegung und steuern somit die Phototaxis (lichtabhängige Bewegung) von *Chlamydomonas*. [24–26]

Die Fähigkeit, Zellmembranen durch Licht zu depolarisieren, ermöglicht den breiten Einsatz insbesondere von Channelrhodopsin-2 in der neuronalen Forschung. Im Jahre 2005 konnte erstmalig gezeigt werden, dass nach einer Expression des Ionenkanals in Säugetierneuronen lichtgesteuerte Aktionspotentiale in den Nervenzellen ausgelöst werden können. [27] Seitdem konnte Channelrhodopsin-2 in einer Reihe von tierischen Nervenzellen eingesetzt werden und eröffnete somit neue Möglichkeiten in einem wichtigen Forschungszweig der Neurowissenschaften, der Optogenetik. [28–34]

Da Retinalproteine eine Vielzahl physiologischer Funktionen verschiedener Organismen beeinflussen und eine breite Anwendung etwa in den Neurowissenschaften finden, ist es von großem wissenschaftlichem Interesse, die genauen Mechanismen der lichtgesteuerten Prozesse zu verstehen. Besonders wichtig ist dabei die offensichtlich genau aufeinander abgestimmte Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und dem Protein, die die Funktion des Photorezeptors nach Lichtanregung bestimmt. Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt daher auf der Untersuchung lichtgesteuerter Reaktionen in zwei Retinalproteinen, Channelrhodopsin-2 und Proteorhodopsin, mit Hilfe zeitaufgelöster Laserspektroskopie. Da der Mechanismus der Kanalöffnung beim Channelrhodopsin-2 bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, beschäftigt sich diese Arbeit insbesondere mit den Prozessen, die direkt nach der Retinalanregung stattfinden und die Kanalöffnung vorbereiten. Es wird dabei gezielt auf die für die Funktion des Proteins wichtigen Faktoren wie strukturelle Besonderheiten des Chromophors und seiner Umgebung eingegangen und deren Auswirkung auf die Dynamik von Photoreaktionen sowie die Veränderungen im Protein nach der Anregung untersucht. Der abschließende Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Absorption des UV-Lichts durch das im Dunkelzustand vorhandene Retinal mit deprotonierter Schiff-Base im grünabsorbierenden Proteorhodopsin. Es werden die Untersuchungen der

## 1 MOTIVATION

---

Primärreaktion dargestellt und die Möglichkeiten alternativer Reaktionsmechanismen im Protein nach UV-Anregung aufgezeigt.

## 2 Theoretischer Hintergrund

Die in diesem Kapitel verwendeten Inhalte stammen aus den Lehrbüchern [35–43]. Die darüber hinaus verwendeten Publikationen werden an entsprechenden Stellen zusätzlich zitiert.

### 2.1 Grundlagen optischer Spektroskopie

Optische Spektroskopie basiert auf dem Prinzip der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Nach Absorption eines Photons durch das zu untersuchende Molekül muss die Energie eines Lichtquants der Differenz zwischen den Energien des besetzten ( $E_j$ ) und des unbesetzten ( $E_i$ ) Niveaus des Moleküls entsprechen:

$$h\nu = E_j - E_i. \quad (1)$$

Das Lambert-Beer'sche-Gesetz beschreibt die Abhängigkeit der Schwächung des Lichtstrahls durch ein Medium von seiner Konzentration  $c$  und der Schichtdicke  $d$ :

$$A(\lambda) = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d, \quad (2)$$

wobei der Proportionalitätsfaktor  $\varepsilon(\lambda)$  der molare Extinktionskoeffizient ist und  $A(\lambda)$  die Absorption der Probe beschreibt.

### 2.1.1 Absorptionsspektroskopie im UV/vis-Bereich

Im ultravioletten (UV) und sichtbaren (vis<sup>3</sup>) Spektralbereich führt bei Molekülen die Absorption eines Lichtquants zur Anregung eines Valenzelektrons aus einem bindenden ( $\sigma$ ,  $\pi$ ) oder nichtbindenden ( $n$ ) in ein antibindendes Orbital ( $\sigma^*$ ,  $\pi^*$ ). Dies kann auch allgemein als ein Übergang aus dem energetisch höchst gelegenen besetzten Molekülorbital (HOMO<sup>4</sup>) in das nächst höhere unbesetzte Molekülorbital (LUMO<sup>5</sup>) beschrieben werden.

Die elektronischen Übergänge können allerdings nur dann stattfinden, wenn das Übergangsdipolmoment  $\mu_{ij}$ , welches die Stärke des Übergangs bestimmt, nicht gleich Null ist:

$$\mu_{ij} = \int \Psi_i^* \mu \Psi_j dt \neq 0, \quad (3)$$

wobei  $\Psi_j$  und  $\Psi_i$  die Wellenfunktionen des Grundzustands und des angeregten Zustands und  $\mu$  der Dipoloperator sind. Die Übergangswahrscheinlichkeit oder auch Oszillatorstärke eines Übergangs ist proportional zu  $|\mu_{ij}|^2$  und dann am größten, wenn die Kernanteile beider Wellenfunktionen den größten Überlapp haben. Daraus resultiert das Franck-Condon-Prinzip, nach dem ein elektronischer Übergang stets vertikal stattfindet und sich die Positionen der Kerne währenddessen nicht ändern. Außerdem existieren weitere Übergangsverbote bzw. Auswahlregeln für den elektronischen Übergang, die die Anzahl möglicher Übergänge bestimmen. Zu den wichtigsten zählt das Spinverbot, nach dem sich die Multiplizität  $M = 2S + 1$  ( $S$ : Spinquantenzahl) bei einem Übergang nicht ändern darf.

Da die elektronische Anregung eines Moleküls gleichzeitig zu einer Schwingungsanregung führen kann, weisen Absorptionsspektren statt diskreter Spektrallinien eine Schwingungsfinestruktur auf, die je nach Polarität des Lösungsmittels unterschiedlich gut aufgelöst werden kann.

---

<sup>3</sup> visible (eng.)

<sup>4</sup> Highest Occupied Molecular Orbital

<sup>5</sup> Lowest Occupied Molecular Orbital

### 2.1.2 Absorptionsspektroskopie im IR-Bereich

Der Infrarot (IR)-Spektralbereich erstreckt sich zwischen etwa 0,78  $\mu\text{m}$  und 1000  $\mu\text{m}$  und kann in drei Teilbereiche unterteilt werden: nahes IR (0,78  $\mu\text{m}$  – 3  $\mu\text{m}$ , 13000  $\text{cm}^{-1}$  – 3333  $\text{cm}^{-1}$ ), mittleres IR (3  $\mu\text{m}$  – 30  $\mu\text{m}$ , 3333  $\text{cm}^{-1}$  – 333  $\text{cm}^{-1}$ ) und fernes IR (30  $\mu\text{m}$  – 1000  $\mu\text{m}$ , 333  $\text{cm}^{-1}$  – 10  $\text{cm}^{-1}$ ). Die Absorption von infrarotem Licht führt dabei zur Anregung von Schwingungen (und Rotationen) im Molekül.

Ein vereinfachtes Modell zur Beschreibung von Molekülschwingungen stellt der harmonische Oszillator dar. Bei diesem Modell werden Moleküle durch Atome, die als Massenpunkte durch eine elastische Feder verknüpft sind, beschrieben. Im Falle zweiatomiger Moleküle gilt somit für die Auslenkung der beiden Massen aus dem Gleichgewichtsabstand das Hooke'sche Gesetz:

$$F = -k(r - r_e), \quad (4)$$

mit  $r_e$ : Gleichgewichtsabstand und  $k$ : Kraftkonstante der Feder.

Daraus folgt für die potentielle Energie des harmonischen Oszillators:

$$V(r) = \frac{1}{2}k(r - r_e)^2 = 2\pi^2\mu\nu_{osz}^2(r - r_e)^2, \quad (5)$$

mit  $\mu$ : reduzierte Masse und  $\nu_{osz}$ : Schwingungsfrequenz des Oszillators.

Nach quantenchemischer Betrachtung ergeben sich für das harmonische Potential folgende Energieeigenwerte:

$$E = h\nu_{osz} \left( v + \frac{1}{2} \right), \quad (6)$$

wobei  $v$  für die Schwingungsquantenzahl ( $v = 0, 1, 2, \dots$ ) steht.

Nach diesem vereinfachten Modell sind die Schwingungsniveaus äquidistant und es gilt die Auswahlregel  $\Delta v = \pm 1$ . Eine bessere Beschreibung liefert allerdings das Modell des anharmonischen Oszillators, bei dem die Dissoziation

des Moleküls sowie die Wechselwirkungen zwischen den Atomen berücksichtigt werden. Die Funktion, die den Verlauf der Potentialkurve mit guter Näherung wiedergibt, ist das Morse-Potential:

$$V(r) = D_e [1 - e^{a(r_e - r)}]^2, \quad \text{mit } a = \sqrt{\frac{k_e}{2D_e}}. \quad (7)$$

$D_e$  ist dabei die Dissoziationsenergie,  $r_e$  der Gleichgewichtsabstand,  $k_e$  die Kraftkonstante im Minimum und  $a$  eine charakteristische Konstante für ein bestimmtes Molekül.

Daraus ergeben sich die Energieeigenwerte des anharmonischen Potentials:

$$E = h\nu_e \left\{ 1 - x_e \left( v + \frac{1}{2} \right) \right\} \left( v + \frac{1}{2} \right), \quad \text{mit } x_e = \frac{h\nu_e}{4D_e}. \quad (8)$$

$x_e$  ist dabei die Anharmonizitätskonstante und  $\nu_e$  die Schwingungsfrequenz um die Gleichgewichtslage.

Die Energieniveaus im anharmonischen Oszillator sind somit nicht mehr äquidistant, sondern ihr Abstand nimmt mit steigender Quantenzahl ab und es gilt die Auswahlregel  $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ .

In einem Molekül können neben den Grundschnwingungen ( $\nu_0 \rightarrow \nu_1$ ) noch weitere Oberton- ( $\nu_0 \rightarrow \nu_n$ ) sowie Kombinationsschnwingungen auftreten. Während die letzteren im nahen infraroten Bereich detektiert werden, werden die Grundschnwingungen im mittleren IR-Bereich beobachtet. Grundschnwingungen können durch ihre Normalschnwingungen, die so genannten Normalmoden, charakterisiert werden. Als Normalmode bezeichnet man dabei die Molekülbewegung, bei der alle Atome die gleiche Schwingungsfrequenz besitzen und dabei durch ihre Ruhelage gehen. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen Valenzschnwingungen (Streckschnwingungen) und Deformationsschnwingungen, bei denen sich der Winkel zwischen den Atomen ändert. Beide Schnwingungsarten werden zusätzlich in *symmetrische* und *antisymmetrische* Moden unterteilt, abhängig



davon, ob sich die Molekülsymmetrie beim Schwingungsvorgang ändert. Insgesamt gibt es in einem N-atomigen Molekül  $3N-6$  (nichtlineares Molekül) bzw.  $3N-5$  (lineares Molekül) Grundschnwingungen.

Da bei einem größeren Molekül eine sehr große Anzahl an Normalschnwingungen angeregt werden kann, werden diese in zwei Hauptklassen unterteilt: die Gerüstschwingungen und die Gruppenschnwingungen. Die Gerüstschwingungen, die auch als *Fingerprint-Banden* bezeichnet werden, liegen bei organischen Molekülen im Bereich unterhalb von  $1500\text{ cm}^{-1}$  und sind aufgrund ihrer Bandenstruktur hochspezifisch für die zu untersuchende Molekülstruktur. Die Schnwingungsfrequenz der Gruppenschnwingungen hingegen ist charakteristisch für eine funktionelle Gruppe und ist fast unabhängig von der Gesamtstruktur des Moleküls. So können in einem Protein sowohl einzelne Aminosäureketten, als auch Schnwingungen des Peptidrückgrats angeregt und untersucht werden. Zu den wichtigsten Schnwingungsbanden des Rückgrats zählen dabei die Amid I-Bande (um  $1650\text{ cm}^{-1}$ ), die hauptsächlich aus C=O-Streckschnwingungen besteht, und Amid II-Bande (um  $1550\text{ cm}^{-1}$ ), die sich aus C-N-Streckschnwingungen und N-H-Deformationsschnwingung zusammensetzt.[44] Die Infrarotspektroskopie an Proteinen stellt somit eine sehr spezifische Methode dar, um sowohl einzelne Seitenketten zu detektieren als auch um Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins abzuleiten.

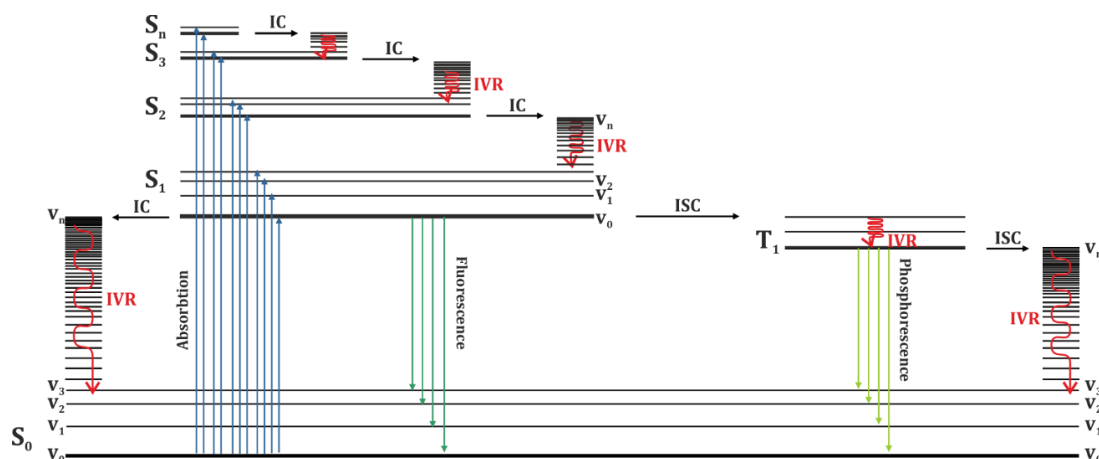
### 2.1.3 Relaxationsprozesse

Elektronische Anregung eines Moleküls führt zunächst zur Besetzung hochfrequenter Schnwingungsniveaus des elektronisch angeregten Zustands, auch als Franck-Condon-Region bekannt. Von dort kann die aufgenommene Energie durch verschiedene strahlende und strahlungslose Prozesse wieder abgegeben werden (siehe Abbildung 1). Zu den schnellsten strahlungslosen Prozessen zählt die intramolekulare Schnwingungsenergieumverteilung (IVR<sup>6</sup>),

---

<sup>6</sup> Intramolecular Vibrational Energy Redistribution (eng.)

bei der die Überschussenergie durch Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Durch anschließende innere Umwandlung (IC<sup>7</sup>) und wiederholte Schwingungsrelaxation kann so das Molekül einen niedriger gelegenen elektronischen Zustand bis hin zu dem Grundzustand  $S_0$  erreichen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung möglicher Relaxationsprozesse nach elektronischer Anregung in einem Jablonski-Diagramm.[39,45] Dabei steht IC für innere Konversion, ISC für Interkombination und IVR für intramolekulare Schwingungsenergieumverteilung.

Zu den strahlenden Prozessen gehören Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz gelangt das Molekül durch spontane Emission aus dem höher gelegenen angeregten Zustand  $S_1$  in den elektronischen Grundzustand  $S_0$ . Das Fluoreszenzspektrum ist relativ zum Absorptionsspektrum meist bathochrom verschoben (Stokes-Verschiebung) und stellt in den meisten Fällen das Spiegelbild des letzteren dar. Da der strahlungslose Zerfall in den Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  in der Größenordnung von 100 fs stattfindet, wird die Fluoreszenz fast immer aus dem niedrigsten angeregten Zustand beobachtet (Kasha-Regel). Außerdem ist ein Fluoreszenzspektrum in der Regel unabhängig von der Anregungswellenlänge (Kasha-Vavilov-Regel).[46]

Darüber hinaus hat ein angeregtes Molekül die Möglichkeit, aus dem  $S_1$ -Zustand über die Spin-Umkehr in einen angeregten Triplett-Zustand  $T_1$  zu gelangen. Dieser Vorgang, auch Interkombination (ISC<sup>8</sup>) genannt, ist spinverboten und

<sup>7</sup> Internal Conversion (eng.)

<sup>8</sup> Intersystem Crossing (eng.)

findet nur bei Molekülen mit starker Spin-Bahn-Kopplung statt. Beim Übergang in den elektronischen Grundzustand, der ebenfalls mit einer Spin-Umkehr verbunden ist, wird Energie in Form von Licht abgegeben, was als Phosphoreszenz bezeichnet wird. Während die Lichtemissionen in Form von Fluoreszenz typischerweise im Bereich von Nanosekunden stattfinden, liegen die Phosphoreszenzlebensdauern im Bereich von Millisekunden bis Sekunden.

## 2.2 Nichtlineare Effekte

Die lineare Optik basiert auf der Annahme, dass die im Medium induzierte Polarisation  $\vec{P}$  proportional zum elektrischen Feld  $\vec{E}$  ist:

$$\vec{P}(t) = \varepsilon_0 \chi \vec{E}(t), \quad (9)$$

mit  $\chi$ : elektrische Suszeptibilität und  $\varepsilon_0$ : Dielektrizitätskonstante. Der lineare Zusammenhang zwischen der Polarisation und der Feldstärke impliziert, dass beim Durchgang durch Materie die Lichtfrequenz konstant bleibt. Bei hohen Feldstärken, wie wir sie bei kurzen Laserpulsen vorfinden können, kann die Polarisation nicht unendlich ansteigen, sodass die Linearität nicht mehr gewahrt werden kann. Die Suszeptibilität ist nun eine Funktion der Feldstärke und die Polarisation lässt sich mit Hilfe einer Reihenentwicklung formulieren:

$$\vec{P}(\vec{E}) = \varepsilon_0 \sum_n \chi^{(n)} \vec{E}^n. \quad (10)$$

Dabei ist  $\chi^{(n)}$  ein Tensor der Ordnung  $(n+1)$ . Die Beiträge höherer Ordnung führen in der nichtlinearen Optik zwangsläufig dazu, dass durch Wechselwirkung mehrerer Lichtbündel neue Frequenzen entstehen können. Da  $\chi^{(n)}$  mit steigendem  $n$  sehr kleine Beiträge annimmt ( $\chi^{(1)} \approx 1, \chi^{(2)} \approx 10^{-10} \frac{cm}{v}, \chi^{(3)} \approx 10^{-17} \frac{cm^2}{v^2}$ ), sind selbst bei hohen Feldern in der Regel nur Beiträge zweiter und dritter Ordnung von Bedeutung.

Betrachtet man zwei sich in Richtung  $\vec{z}$  ausbreitende elektromagnetische Wellen mit den Frequenzen  $\omega_1$  und  $\omega_2$  und den Impulsen  $\vec{k}_1$  und  $\vec{k}_2$ , so ergibt sich für das elektrische Feld  $\vec{E}$ :

$$\vec{E} = \vec{E}_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \cdot \vec{z}) + \vec{E}_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \cdot \vec{z}). \quad (11)$$

Unter Berücksichtigung der trigonometrischen Zusammenhänge

$$\cos^2(\alpha) = \frac{1}{2}(1 + \cos(2\alpha)) \quad \text{und} \quad \cos(\alpha)\cos(\beta) = \frac{1}{2}(\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta))$$

kann die Polarisation zweiter Ordnung folgendermaßen beschrieben werden:

$$\begin{aligned} \vec{P}^{(2)}(\omega) = \frac{1}{2}\epsilon_0\chi^{(2)} & \left( \vec{E}_1^2 + \vec{E}_2^2 + \vec{E}_1^2 \cos(2\omega_1 t + 2\vec{k}_1 \vec{z}) \right. \\ & + \vec{E}_2^2 \cos(2\omega_2 t + 2\vec{k}_2 \vec{z}) \\ & + \frac{\vec{E}_1 \vec{E}_2 \cos((\omega_1 + \omega_2)t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2)\vec{z})}{2} \\ & \left. + \frac{\vec{E}_1 \vec{E}_2 \cos((\omega_1 - \omega_2)t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2)\vec{z})}{2} \right). \end{aligned} \quad (12)$$

Anhand der Gleichung erkennt man deutlich, dass die Überlagerung zweier Wellen unter Berücksichtigung nichtlinearer Anteile zur Erzeugung neuer Frequenzen führt. So bezeichnet man die Terme  $2\omega_1$  und  $2\omega_2$  als Frequenzverdopplung (SHG<sup>9</sup>),  $(\omega_1 + \omega_2)$  als Summenfrequenz- (SFG<sup>10</sup>) und  $(\omega_1 - \omega_2)$  als Differenzfrequenzerzeugung (DFG<sup>11</sup>). Durch Auswahl geeigneter experimenteller Parameter können einzelne Prozesse, auch Dreiwellenmischprozesse genannt, verstärkt werden.

### 2.2.1 Phasenanpassung

Bei Dreiwellenmischprozessen muss die Energie- und Impulserhaltung berücksichtigt werden. Mit  $E = \hbar\omega$  und  $\vec{p} = \hbar\vec{k}$  ergibt sich:

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2 + \Delta E \quad (13)$$

$$\hbar\vec{k}_3 = \hbar\vec{k}_1 + \hbar\vec{k}_2 + \Delta\vec{k}. \quad (14)$$

<sup>9</sup> Second Harmonic Generation (eng.)

<sup>10</sup> Sum Frequency Generation (eng.)

<sup>11</sup> Difference Frequency Generation (eng.)

Neben der Energieerhaltung  $\Delta E = 0$  muss auch die Phasenfehlanpassung  $\Delta \vec{k}$  möglichst gleich Null sein, um eine möglichst effiziente Wellenlängenkonversion zu erreichen. Dies kann realisiert werden, indem man die nichtlinearen Eigenschaften doppelbrechender Kristalle nutzt. Der Brechungsindex derartiger Kristalle ändert sich abhängig von der Polarisation des elektrischen Feldes der eingestrahlten Welle. Je nach Anzahl optischer Achsen werden solche anisotropen Kristalle in bi- und uniaxiale unterteilt. Die in der Phasenanpassung am häufigsten verwendeten uniaxialen Medien besitzen neben zwei Hauptachsen mit zwei unterschiedlichen Brechungsindizes eine optische Achse, die die Raumrichtung vorgibt. So kann jeder Laserstrahl, der auf einen solchen Kristall trifft, in zwei Strahlen aufgeteilt werden. Der eine Strahl ist senkrecht zur optischen Achse polarisiert und wird als ordentlich (*o*)<sup>12</sup> bezeichnet. Sein Brechungsindex ist unabhängig vom Winkel  $\theta$  zwischen optischer Achse und der Ausbreitungsrichtung. Der außerordentliche Strahl (*e*)<sup>13</sup> ist parallel zu der Ebene, die zwischen der Ausbreitungsrichtung und der optischen Achse aufgespannt wird, und die Abhängigkeit seines Brechungsindex  $n_e$  vom Winkel  $\theta$  lässt sich wie folgt ausdrücken:

$$\frac{1}{n_e(\omega, \theta)} = \sqrt{\frac{\cos^2 \theta}{n_o^2(\omega)} + \frac{\sin^2 \theta}{n_e^2(\omega)}}. \quad (15)$$

Dadurch, dass beide Strahlen unterschiedliche Brechungsindizes erfahren, ist ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit durch das Medium nicht identisch. So kann durch eine geeignete Wahl des Winkels  $\theta$  die Phasenanpassung optimiert und die erwünschte Wellenlängenkonversion erreicht werden.

---

<sup>12</sup> Ordinary (eng.)

<sup>13</sup> Extraordinary (eng.)

### 2.2.2 Optisch-parametrische Verstärkung

Neben den oben genannten Dreiwellenmischprozessen wie der Frequenzverdopplung und der Summen- und Differenzfrequenzbildung erlauben die nichtlinearen Effekte zweiter Ordnung auch die Erzeugung von Licht mit durchstimmbarer Wellenlänge. Dies geschieht durch die Aufspaltung einer hochenergetischen Welle, auch *Pump* genannt, nach dem Prinzip der Differenzfrequenzbildung in die zwei niederenergetischen Lichtwellen *Signal* und *Idler*. So entsteht nach Einstrahlen der *pump*-Welle in einen nichtlinearen Kristall unter Bildung so genannter parametrischer Fluoreszenz zunächst eine höchstmögliche Anzahl an *Signal*- und *Idler*-Paaren. Wird dabei zusätzlich eine schwache Welle, genannt *Seed*, in den Kristall eingekoppelt, kann diese gezielt verstärkt werden. Man spricht dabei von optisch-parametrischer Verstärkung (OPA<sup>14</sup>).[47] Neben einer kollinearen Anordnung können *Seed*- und *Pump*-Strahl auch unter einem bestimmten Winkel in den Kristall eingekoppelt werden (NOPA<sup>15</sup>).[48] Dies erlaubt eine breitbandige parametrische Verstärkung.

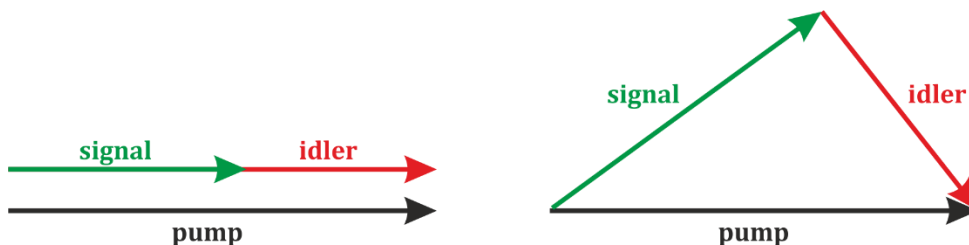


Abbildung 2: Kollineare und nicht kollineare Anordnung für optisch-parametrische Verstärkung.

### 2.2.3 Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Bei allen transparenten Medien beobachtet man im Spektralbereich des sichtbaren Lichts eine Abhängigkeit des Brechungsindex  $n$  von der Lichtwellenlänge  $\lambda$ , die so genannte normale Dispersion:

<sup>14</sup> Optical Parametric Amplification (eng.)

<sup>15</sup> Non-collinear Optical Parametric Amplifier (eng.)

$$n = n(\lambda). \quad (16)$$

Aus diesem Grund ist auch die Gruppengeschwindigkeit des Lichts  $v_{gr}$ , also die Geschwindigkeit, mit der sich ein Wellenpaket als Ganzes fortbewegt, wellenlängenabhängig:

$$v_{gr} = \frac{\partial \omega}{\partial \vec{k}}, \quad \text{mit } \vec{k} = \frac{2\pi n}{\lambda}. \quad (17)$$

Da sehr kurze Laserpulse nicht mehr als monochromatisch angesehen werden können, laufen ihre Spektralkomponenten während der Propagation durch ein Medium auseinander. Es kommt zum so genannten *Chirp*, bei dem die langwelligen Anteile des Pulses den kurzwelligen vorauslaufen, und einer damit verbundenen Pulsverbreiterung. Die normale Dispersion ( $\frac{dn}{d\lambda} < 0$ ) führt dabei zu einem positiven und die anormale ( $\frac{dn}{d\lambda} > 0$ ) zu einem negativen *Chirp*. Da die Pulsdauer  $\Delta t$  ohne *Chirp* am geringsten ist, ist es notwendig, bei spektroskopischen Untersuchungen mit hoher Zeitauflösung durch Einsatz von z.B. Gitter- und Prismenkompressoren die Gruppengeschwindigkeitsdispersion zu kompensieren.

### 2.2.4 Erzeugung ultrakurzer Laserpulse

Um Reaktionsdynamiken mit einer sehr hohen Zeitauflösung beobachten zu können, müssen Laserpulse mit einer Pulsdauer im Femtosekundenbereich erzeugt werden. Dabei ist die Dauer eines Pulses  $\Delta t$  gemäß der Heisenbergschen Unschärferelation durch seine Bandbreite  $\Delta\omega$  limitiert:

$$\Delta\omega\Delta t \geq \frac{h}{2\pi}. \quad (18)$$



Das bedeutet, dass bei der Erzeugung ultrakurzer Pulse nur Laser mit einer entsprechenden spektralen Bandbreite genutzt werden können. Da allerdings in einem Laserresonator diskrete Frequenzen erzeugt werden, die die Bedingung für eine stehende Welle zwischen den Resonatorspiegeln erfüllen, bedient man sich des Prinzips der Modenkopplung. Ziel der Modenkopplung ist die konstruktive Überlagerung longitudinaler Moden mit einer festen Phasenbeziehung im Resonator. Dabei hängt die Dauer der Pulse von der Anzahl gleichzeitig gekoppelter Moden ab. Als Ergebnis erhält man eine Serie intensiver Laserpulse mit der Repetitionsrate  $f$ , die definiert ist durch:

$$f = \frac{1}{T} = \frac{c}{2L}, \quad (19)$$

Dabei ist  $T$  der zeitliche Abstand der Maxima und  $L$  die Resonatorlänge.

Man unterscheidet zwei Arten der Modenkopplung: aktive und passive Modenkopplung. Bei der **aktiven Modenkopplung** nutzt man schnelle optische Schalter wie z.B. eine Pockels-Zelle, eine Kerr-Zelle oder einen akusto-optischen Modulator (AOM), die mit der Frequenz  $f = \frac{c}{2L}$  des Laserpulses geöffnet werden. Wenn die Modulationsfrequenz dem Modenabstand entspricht, erzeugt man Seitenbänder mit einer festen Phasenbeziehung, die zu eigenständigen Moden werden und weitere Seitenbänder bilden können. Dabei erfolgt eine gezielte Verstärkung der mit dem Puls des Resonators umlaufenden Moden. Durch die Interferenz der Moden erzeugt man kurze Laserpulse, deren Pulsdauer durch die maximal erreichbare Modulationsfrequenz (einige GHz) limitiert ist. Die **passive Modenkopplung** kann durch verschiedene Techniken realisiert werden. Zum einen können sättigbare Absorber wie Farbstoffe oder Halbleiter mit einem intensitätsabhängigen Absorptionsverhalten eingesetzt werden. Dabei werden Moden mit mittlerer und schwacher Intensität absorbiert, während die intensivsten Moden die größte Verstärkung erfahren. Nach wenigen Resonatorumläufen können so intensive Pulse mit einer Pulsdauer von unter 1 ps erzeugt werden.

Eine weitere Möglichkeit stellt die *Kerr-Linsen-Modenkopplung* dar.[49,50] Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass der Brechungsindex eines nichtlinearen Mediums wie z.B. eines Ti:Saphir-Kristalls von der Intensität des eingestrahnten Lichts abhängt:

$$n(I) = n_0(\omega) + n_2(\omega)I. \quad (20)$$

Abhängig davon, ob der nichtlineare Brechungsindex  $n_2$  größer oder kleiner Null ist, kann so ein Medium als Zerstreuungs- oder Sammellinse wirken. Bei  $n_2 > 0$  kommt es zur Selbstfokussierung des Laserstrahls und eine kreisförmige Blende sorgt schließlich dafür, dass nur intensive Moden ungeschwächt transmittiert werden. In einem Ti:Saphir-Laser, bei dem die Selbstfokussierung in einem Ti:Saphir-Kristall erfolgt, können so ca.  $10^6$  Moden miteinander gekoppelt und Pulsdauern von bis zu 10 fs erreicht werden.

Einen Spezialfall der passiven Modenkopplung stellen Faseroszillatoren dar, bei denen optische Fasern wie z.B. mit Erbium-Ionen dotierte Glasfasern als nichtlineares Medium eingesetzt werden.[51,52] Dabei wird ein intensiver Laserpuls in eine optische Faser geleitet, wodurch es zur intensitätsabhängigen Änderungen seines Polarisationszustandes kommt. Die Auskopplung der Pulse erfolgt in der Regel mit Hilfe eines Faraday-Rotators, der bei einer geeigneten Anordnung die maximale Transmission der Pulse mit höchstmöglicher Intensität gewährleistet.

## 3 Experimenteller Aufbau

### 3.1 Anreg-Abtast<sup>16</sup>-Spektroskopie

Die Untersuchung von lichtgesteuerten Reaktionen erfordert eine sehr hohe Zeitauflösung, die durch den Einsatz von gepulsten Lasern mit Pulsdauern im Femtosekundenbereich erreicht werden kann. Dabei bedient man sich einer mittlerweile gängigen Technik zur Beobachtung des Reaktionsverlaufs nach der Lichtanregung, der so genannten Anreg-Abtast-Spektroskopie (im Weiteren: *pump-probe*-Spektroskopie). Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe zunächst mit einem Anregungspuls (*pump*-Puls) angeregt und somit in einen höher gelegenen elektronischen oder vibronischen Zustand versetzt. Dieser Vorgang löst eine mögliche Photoreaktion aus und definiert den Zeitnullpunkt der Messung. Die Dynamik der nachfolgenden Prozesse wird anschließend mit einem zeitlich verzögerten Abtastpuls (*probe*-Puls) abgefragt, indem die Transmission zu einem definierten Zeitpunkt gemessen wird. Durch eine zusätzliche Messung ohne Anregung der Probe, die durch den Einsatz eines (oder mehrerer) *Chopper*-Rads bewerkstelligt wird, kann anschließend die Absorptionsänderung bestimmt werden. Die zeitliche Verzögerung zwischen dem *pump*- und dem *probe*-Puls wird über einen auf einem Verschiebetisch montierten Retroreflektor realisiert, der seine Position in kleinen Schritten im  $\mu\text{m}$ -Bereich ändert. So kann durch die Änderung der Weglänge anschließend auf die zeitliche Verzögerung des Pulses geschlossen werden. Die maximale Verzögerung ist dabei durch die Länge des Verschiebetisches definiert, die bei den für die Arbeit verwendeten Aufbauten 30 cm beträgt. Dies entspricht einem maximalen zeitlichen Versatz zwischen den beiden Pulsen von 2 ns. Obwohl die kürzeste Weglängendifferenz bei 2  $\mu\text{m}$  liegt und somit eine zeitliche Verzögerung von etwa 7 fs erreicht werden kann, ist die Zeitauflösung des Experiments durch die Pulslänge limitiert.

---

<sup>16</sup> Im Weiteren: *pump-probe* (eng.)

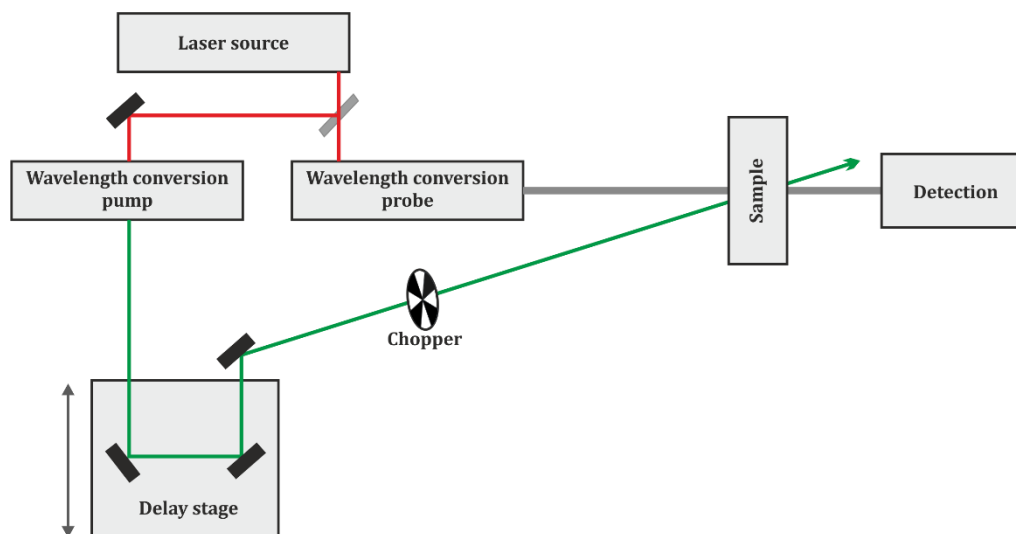


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines *pump-probe*-Experiments.

### 3.1.1 Laserquelle

Zur Erzeugung der Lichtpulse im Femtosekundenbereich wurden für diese Arbeit die kommerziellen Lasersysteme Clark MXR-CPA-2001 und Clark MXR-CPA-iSeries (Horiba Jobin Yvon GmbH, Bensheim) verwendet. Sie bestehen aus einem Diodenlaser, einem Erbium-Glasfaser-Oszillator, einem Nd:YAG<sup>17</sup>-Laser sowie einem Ti:Saphir-Verstärker. Der Diodenlaser ist ein InGaAs<sup>18</sup>-Halbleiterlaser, der bei 980 nm mit einer Leistung von etwa 160 mW im Dauerstrichmodus emittiert und als optische Pumpe für den Glasfaserlaser eingesetzt wird. Der Oszillator ist als Ringresonator aufgebaut und nutzt eine mit Erbium-Ionen dotierte Glasfaser als aktives Medium. Er emittiert Lichtpulse der Wellenlänge von 1550 nm mit einer Repetitionsrate von 35 MHz. Nach dem Auskoppeln der Laserpulse werden diese mit einem Prismenkompressor komprimiert und in einem PPLN<sup>19</sup>-Kristall frequenzverdoppelt. Dabei erhält man 100 fs kurze Laserpulse der Wellenlänge von 775 nm und der Pulsenergie von etwa 100 pJ. Die anschließende Verstärkung erfolgt in einem mit Ti<sup>3+</sup>-Ionen dotiertem Saphir-Kristall mit einem nutzbaren Emissionsbereich zwischen 600

<sup>17</sup> Neodym dotierter Yttrium-Aluminium-Granat

<sup>18</sup> Indium-Galium-Arsenit

<sup>19</sup> Periodically Poled Lithium Niobate (eng.)

nm und 1000 nm. Als Pumpquelle des Verstärkers dient dabei ein Nd:YAG-Laser, dessen intensive Lichtpulse der Wellenlänge von 1064 nm in einem KTP<sup>20</sup>-Kristall frequenzverdoppelt und anschließend in den Verstärker eingekoppelt werden. Gleichzeitig koppelt man in den Ti:Saphir-Kristall den Puls des Faserresonators ein, der nach der maximalen Verstärkung mit Hilfe einer Pockelszelle wieder ausgekoppelt wird.

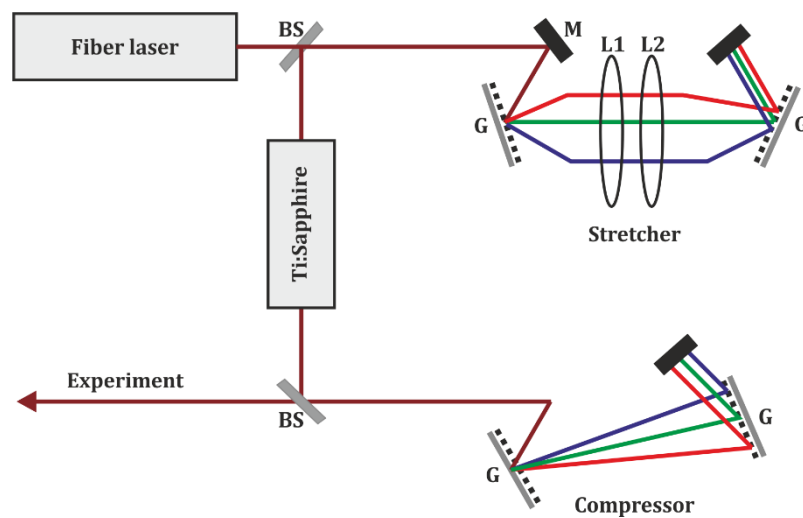


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines CPA. BS<sup>21</sup>: Strahlteiler, L: Linse, M<sup>22</sup>: Spiegel, G: optisches Gitter.

Um eine Beschädigung der optischen Komponenten durch eine zu hohe Spitzenintensität zu vermeiden, benutzt man für die Pulsverstärkung das so genannte CPA<sup>23</sup>-Prinzip (siehe Abbildung 4).[53,54] Dazu werden die Femtosekundenpulse vor der Verstärkung zunächst durch einen Gitter-*Stretcher* „gechirpt“ und dadurch zeitlich verbreitert und nach der Verstärkung durch einen baugleichen Gitterkompressor wieder komprimiert. So erhält man ultrakurze Laserpulse der Zentralwellenlänge von 775 nm mit Pulsdauern von  $\sim 170$  fs und Pulsenergien von  $\sim 800$   $\mu$ J bei einer Repetitionsrate von 1 kHz.

<sup>20</sup> Kaliumtitanylphosphat

<sup>21</sup> Beam Splitter (eng.)

<sup>22</sup> Mirror (eng.)

<sup>23</sup> Chirped Pulse Amplification (eng.)

### 3.1.2 Erzeugung von Anregungspulsen

Um eine effektive Anregung der Probe bei einer bestimmten Wellenlänge zu gewährleisten, müssen die aus dem Laser ausgekoppelten Lichtpulse der festen Wellenlänge von 775 nm verschiedenen nichtlinear-optischen Prozessen unterzogen werden. In den im Weiteren beschriebenen Experimenten stehen dabei die Frequenzverdopplung (SHG<sup>24</sup>), die Frequenzverdreifachung (THG<sup>25</sup>), nichtkollinear optisch-parametrische Verstärkung (NOPA<sup>26</sup>) sowie die Summenfrequenzerzeugung (SFG<sup>27</sup>) zur Verfügung.

#### Frequenzverdopplung (SHG)

Die Frequenzverdopplung stellt einen Sonderfall der Summenfrequenzbildung dar (siehe 2.2), bei dem die beiden einlaufenden Photonen die gleiche Frequenz besitzen. Dabei wird ein Laserpuls der Frequenz  $\omega$  in einem nichtlinearen Kristall in einen Puls der Wellenlänge  $2\omega$  umgewandelt. Praktisch geschieht dies durch die Einkopplung der Laserfundamentalen in einen 0,5 mm dicken BBO<sup>28</sup>-Kristall ( $\theta = 30^\circ$ ) und man erhält anschließend Laserpulse der Wellenlänge von 388 nm.

#### Frequenzverdreifachung (THG)

Nach dem SHG-Prozess kann in einem weiteren BBO-Kristall ( $\theta = 45^\circ$ ) die Summenfrequenz aus dem frequenzverdoppelten Puls und der Laserfundamentalen erzeugt werden. Dazu wird die Polarisation der beiden Wellen zusätzlich durch den Einsatz eines  $\lambda/2$ -Plättchens optimiert. Die in dem Kristall erzeugte Welle der Frequenz  $3\omega$  ( $\lambda = 258$  nm) wird anschließend als Anregungspuls zur Probe geleitet.

---

<sup>24</sup> Second Harmonic Generation (eng.)

<sup>25</sup> Third Harmonic Generation (eng.)

<sup>26</sup> Non-collinear Optical Parametric Amplifier (eng.)

<sup>27</sup> Sum Frequency Generation (eng.)

<sup>28</sup>  $\beta$ -Bariumborat

### Nichtkollinear optisch-parametrischer Verstärker (NOPA)

Mit Hilfe eines NOPA-Aufbaus[48] ist es möglich, einen Lichtpuls mit durchstimmbarer Wellenlänge zu erzeugen (siehe auch 2.2.2). Dabei handelt es sich um einen nichtlinearen Prozess zweiter Ordnung. Als Pumpimpuls wird die Frequenzverdoppelte in einen BBO-Kristall ( $d = 2 \text{ mm}$ ,  $\theta = 28,5^\circ$ ) fokussiert. Als *Seed*-Puls dient breitbandiges Weißlicht, welches mit dem *Pump*-Puls im Kristall räumlich und zeitlich überlagert wird. Durch geeignete zeitliche Verzögerung und den Kippwinkel des Kristalls kann eine bestimmte Wellenlänge des Weißlichts ausgewählt und verstärkt werden. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 5 dargestellt. Auf diese Weise können im sichtbaren Spektralbereich Lichtpulse der Wellenlänge zwischen 470 nm und 700 nm erzeugt werden.

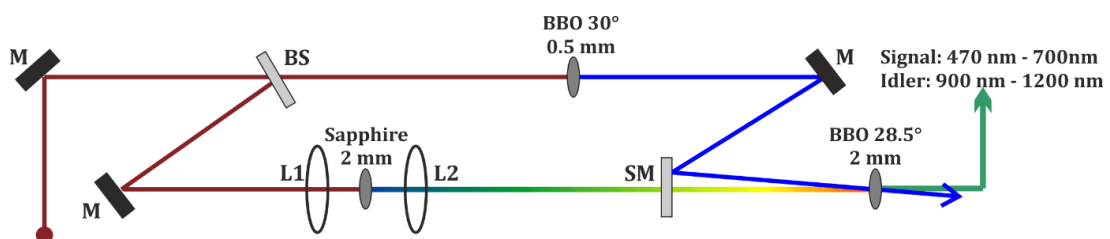


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines NOPA-Aufbaus. M: Spiegel, BS: Strahlteiler, L: Linse, SM<sup>29</sup>: Hohlspiegel.

### Summenfrequenzerzeugung

Um durchstimmbare Lichtpulse im UV-Bereich zu erzeugen, kann das Prinzip der Summenfrequenzbildung aus der Laserfundamentalen und dem NOPA-Puls benutzt werden.[55] Durch die Überlagerung der beiden Lichtstrahlen in einem geeigneten BBO-Kristall ( $d = 0,1 \text{ mm}$ ,  $\theta = 45^\circ$ ) können so Pulse im Bereich von 290 nm bis 450 nm generiert werden.

<sup>29</sup> Spherical Mirror (eng.)

#### **3.1.3 Aufbau des *pump-probe*-Experiments im UV/vis-Bereich**

Der Aufbau des UV/vis-*pump*-UV/vis-*probe*-Experiments ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Zu Beginn wird die Laserfundamentale der Wellenlänge von 775 nm in zwei Teile aufgeteilt. Der erste Teil wird dazu benutzt, um Anregungspulse zu generieren. Je nach erwünschter Wellenlänge kann dabei die Frequenzverdoppelte oder der komprimierte NOPA-Puls zur Anregung der Probe benutzt oder auch ein UV-Puls unter Verwendung der Summenfrequenzbildung generiert werden. Der andere Teil der Laserfundamentalen wird dazu benutzt, um ein Superkontinuum-Weißlicht zu erzeugen, welches als Abtastlicht eingesetzt wird. Dies geschieht durch Fokussierung des Laserpulses in ein transparentes Medium, was zu einer spektralen Verbreiterung des Pulses führt. Für die hier vorgestellten Experimente wurden Saphir und CaF<sub>2</sub> als solches Medium verwendet. Während mit Saphir generiertes Weißlicht den Spektralbereich zwischen 450 nm und 1600 nm abdeckt, liefert Calciumfluorid bereits Beiträge ab 340 nm. Da allerdings bei CaF<sub>2</sub> schon nach einer kurzen Bestrahlungsdauer Degradationserscheinungen auftreten, muss das verwendete Plättchen bewegt werden. Dies wiederum erniedrigt die Stabilität des erzeugten Weißlichts und führt letztendlich zu einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Vor dem Durchgang durch die Probe wird der Superkontinuumstrahl geteilt, so dass nur ein Teil durch die Probe und der andere als Referenz direkt auf das Spektrometer geleitet wird. Die spektrale Auflösung kann dabei, je nach verwendetem Gitter, zwischen 4 nm und 8 nm eingestellt werden. Durch Verwendung eines  $\lambda/2$ -Plättchens kann zusätzlich die Polarisation zwischen Anregungs- und Abtastpuls eingestellt werden. Bei den hier beschriebenen Experimenten betrug der Polarisationswinkel 54,7° („magischer Winkel“). Der Probenaustausch wurde durch permanente Bewegung der Küvette gewährleistet.



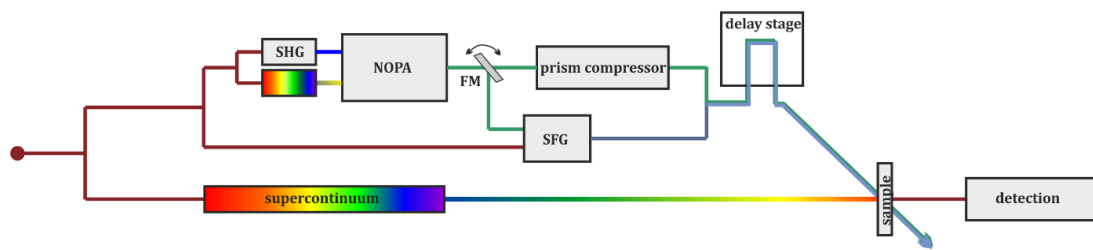


Abbildung 6: Aufbau des UV/vis-pump-UV/vis-probe-Experiments. FM<sup>30</sup>: klappbarer Spiegel.

Aufgrund der Wechselwirkungen von Anregungs- und Abtastpuls in der Probe können bei transienten Absorptionsmessungen am Zeitnullpunkt kohärente Effekte auftreten. Da die beiden Pulse am Anfang der Messung gleichzeitig die Probe passieren, kommt es zu einer Wechselwirkung des Anregungspulses mit dem Lösungsmittel, wodurch der Abtastpuls einen veränderten Brechungsindex erfährt. Dies äußert sich in einem intensiven Signal, welches als Kreuzphasenmodulation bezeichnet wird. Zur Korrektur der aufgenommenen Daten kann daher ein transientes Spektrum des Lösungsmittels unter den gleichen Messbedingungen aufgenommen und vom Spektrum der Probe abgezogen werden.

### 3.1.4 Der UV/vis-pump-IR-probe-Aufbau

Die für die hier beschriebenen Experimente verwendete Anlage wurde von Dr. Karsten Neumann (AG Wachtveitl, Goethe Universität, Frankfurt am Main) aufgebaut und in [56] ausführlich beschrieben. Es soll daher nur kurz auf die Erzeugung der Abtastpulse sowie auf das Auftreten möglicher Messartefakte eingegangen werden.

Die Erzeugung breitbandiger, durchstimmbarer Abtastpulse im mittleren Infrarotbereich basiert bei dem hier verwendeten Aufbau auf einem zweistufigen OPA<sup>31</sup>-Prozess mit anschließender Differenzfrequenzbildung.[47,57] Der schematische Aufbau ist in Abbildung 7 dargestellt. Zunächst wird der vom Laser kommende Strahl in drei Teile

<sup>30</sup> Flip Mirror (eng.)

<sup>31</sup> Optical Parametric Amplification (eng.)

aufgeteilt. Der eine Teil wird dabei zur Erzeugung des Weißlichts (*Seed*) in einem Saphir-Kristall benutzt, während die weiteren zwei Teile als Pumpstrahlen für den OPA-Prozess in einem BBO-Kristall eingesetzt werden. Der in der ersten Stufe generierte *Signal*-Puls, der zwischen  $1,2\ \mu\text{m}$  und  $1,45\ \mu\text{m}$  durchgestimmt werden kann, wird vom *Idler*-Strahl abgetrennt und wieder zusammen mit dem Pumpimpuls in den BBO-Kristall eingekoppelt. Die so generierten *Signal*- und *Idler*-Pulse werden zunächst über eine variable Verzögerungsstrecke voneinander getrennt und anschließend zwecks der Differenzfrequenzerzeugung in einen  $\text{AgGaS}_2$ -Kristall fokussiert.

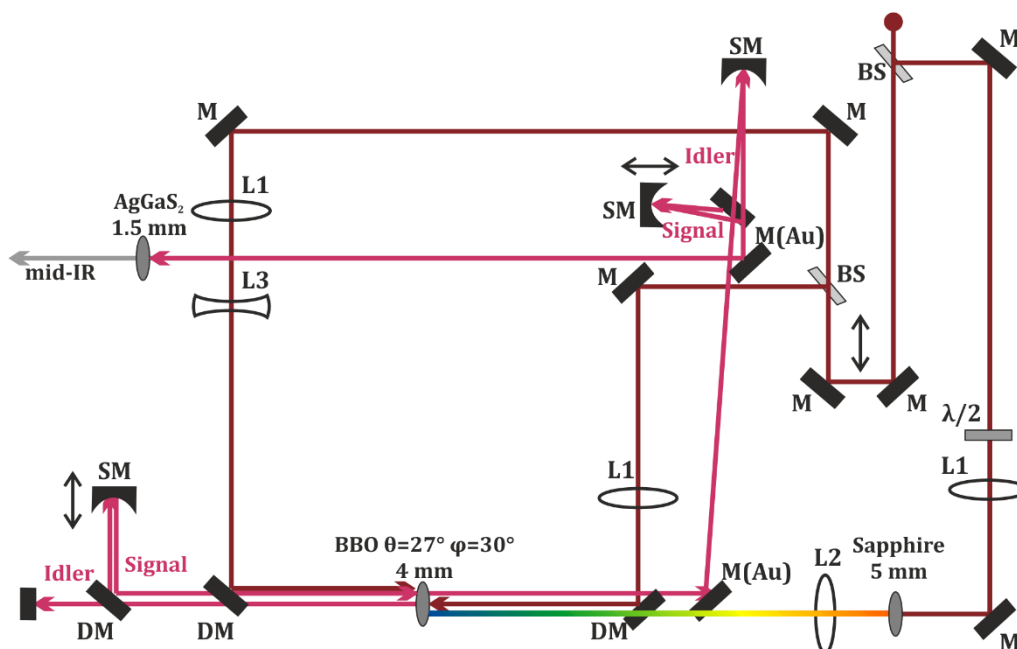


Abbildung 7: Schematischer Aufbau ultrakurzer Laserpulse im mittleren Infrarotbereich mit zweistufigem OPA und Differenzfrequenzbildung. M: Spiegel, L: Linse, BS: Strahlenteiler, SM: Hohlspiegel, DM<sup>32</sup>: dichroitischer Spiegel.

So erhält man durchstimmbare Pulse zwischen  $3\ \mu\text{m}$  und  $10\ \mu\text{m}$  mit Pulsenergien im Bereich von einigen  $\mu\text{J}$ . Vor dem Durchgang durch die Probe wird der Abtaststrahl geteilt, so dass nur ein Teil mit dem Anregungspuls in der Probe überlagert wird und der andere als Referenz dient. Die Detektion erfolgt in einem Spektrometer mit angeschlossenen, mit flüssigem Stickstoff

<sup>32</sup> Dichroic Mirror (eng.)

---

gekühltem MCT<sup>33</sup>-Detektor, bestehend aus zwei aufeinanderliegenden 32-Kanal-Zeilen. Bei den im Weiteren vorgestellten Messungen wurden aufgrund defekter Referenz-Kanäle keine Referenzmessungen durchgeführt.

Da vor dem Zeitnullpunkt, der durch die Anregung festgelegt wird, der Abtastpuls bereits vor dem Anregungspuls die Probe erreicht, erzeugt dieser eine kohärente Polarisierung, die mit der Dephasierungszeit  $T_2$  zerfällt. Wenn nun dieser Zerfall, auch freier Induktionszerfall genannt, vom Anregungspuls gestört wird, führt dies zu einer Veränderung der Transmission der Probe und einem Signalbeitrag vor dem Zeitnullpunkt. Diesen Vorgang nennt man gestörten freien Induktionszerfall (PFID<sup>34</sup>). [58] Dabei ist die Dephasierungszeit  $T_2$  umgekehrt proportional zu der Halbwertsbandbreite  $\Delta\bar{\nu}$  des zugehörigen Übergangs:

$$T_2 = \frac{1}{\pi c \Delta\bar{\nu}}. \quad (21)$$

So ergeben sich für typische IR-Banden, deren Bandbreiten im Bereich weniger Wellenzahlen liegen, Zerfallszeiten im Zeitbereich weniger Pikosekunden, was die verwendeten Pulsdauern deutlich übersteigt und nicht vernachlässigt werden kann. Da dieser Effekt allerdings nur bei der Resonanzfrequenz auftritt, kann mit Hilfe des PFID-Signals die Position und Breite der IR-Banden, die auf die Anregung der Probe zurückzuführen sind, genau bestimmt werden. Doch aufgrund des PFID-Signals und der am Zeitnullpunkt auftretenden Kreuzphasenmodulation konnten die im Folgenden vorgestellten IR-Messungen erst ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps ausgewertet werden.

### 3.1.5 Datenauswertung

Die Auswertung transientser Absorptionsspektren erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms OPTIMUS [59] sowie der auf IDL 6.0 basierenden

---

<sup>33</sup> Mercury Cadmium Telluride (eng.)

<sup>34</sup> Perturbed Free Induction Decay (eng.)

*Software z20* (LMU München). Die detaillierte Beschreibung beider Programme ist in [59,60] zu finden.

Nach einer Mittelung der aufgenommenen *Scans* erfolgte bei den transienten Absorptionsmessungen im sichtbaren und UV-Bereich zunächst die Korrektur des kohärenten Artefakts über das Abziehen der Lösemittelsignale sowie die Zeitnullpunktskorrektur, die aufgrund eines positiven Chirps der Abtastpulse notwendig ist. Anschließend wurde die globale Fitanalyse durchgeführt, indem an den aufgenommenen Datensatz eine Summe aus  $n$  exponentiellen Zerfallsfunktionen angepasst wurde. Dabei ist die zeit- und wellenlängenabhängige Absorptionsänderung gegeben durch:

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n A_i(\lambda) \exp\left(\frac{t_k^2}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right) \left[ \frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{t}{t_k} - \frac{t_k}{2\tau_i}\right) + \frac{1}{2} \right], \quad (22)$$

mit der Kreuzkorrelationsbreite  $t_k$  und der Amplitude  $A_i$  der Zeitkonstanten  $\tau_i$ . Die  $\operatorname{erf}(x)$  ist die so genannte Fehlerfunktion und ist definiert durch:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt. \quad (23)$$

Die Anzahl der Zerfallsfunktionen  $n$  wird vor der Anpassungsprozedur vorgegeben und man erhält als Ergebnis  $n$  Zeitkonstanten  $\tau_i$  sowie die dazugehörigen zerfallsassozierten Spektren (DAS<sup>35</sup>). Dabei werden die Absorptionsänderungen, die außerhalb der Messzeit liegen, zusätzlich durch eine unendlich-Zeit beschrieben ( $\tau = \text{inf.}$ ).

Bei transienten Absorptionsmessungen im IR-Bereich wurde keine zusätzliche Korrektur des kohärenten Artefakts durchgeführt. Die Messungen wurden stattdessen ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps unter Verwendung der globalen Fitanalyse ausgewertet.

---

<sup>35</sup> Decay Associated Spectra (eng.)

## 3.2 Das Blitzlichtphotolyse-Experiment

Um transiente Absorptionsänderungen im Zeitbereich zwischen einigen hundert Nanosekunden und Sekunden aufzunehmen, können Blitzlichtphotolyse-Experimente durchgeführt werden. Dabei wird mit Hilfe eines kurzen Laserpulses mit Pulsdauern im Nanosekundenbereich (hier: Nd:YAG-Laser) die Photoreaktion ausgelöst, während die Transmission des zum Anregungspuls senkrecht eingestrahnten Weißlichts gemessen wird. Im Folgenden wird der experimentelle Aufbau kurz zusammengefasst. Die vollständige Beschreibung ist in [61] zu finden.

### 3.2.1 Nd:YAG-Laser

Der als Anregungsquelle eingesetzte Nd:YAG-Laser ist ein Festkörperlaser mit einem mit  $\text{Nd}^{3+}$ -Ionen dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Kristall (kurz YAG) als aktives Medium. Der Laser wird von einer Xe-Lampe gepumpt und erzeugt Laserstrahlung mit einer Zentralwellenlänge von 1064 nm. Die aktive Güteschaltung erfolgt über eine Pockelszelle, kombiniert mit einem Polarisator. So können Lichtpulse mit Pulsdauern im Nanosekundenbereich erzeugt werden. Um den Laserbetrieb mit unterschiedlichen Repetitionsraten zu ermöglichen, ist vor der Auskopplung der Pulse ein mechanischer *Shutter* eingebaut. Nach der Auskopplung werden die Laserstrahlen anschließend in zwei  $\text{LBO}^{36}$ -Kristallen frequenzverdreifacht.

Zur Erzeugung von Laserpulsen mit durchstimmbarer Wellenlänge wird ein kommerziell erhältlicher optisch-parametrischer Oszillator (preciScan, GWU Lasertechnik, Erfstadt) eingesetzt. Dabei wird der ausgekoppelte Laserstrahl der Wellenlänge von 355 nm in einen BBO-Kristall eingekoppelt. Durch die Änderung des Kippwinkels des Kristalls kann die Wellenlänge des *Signal*- und des *Idler*-Strahls variiert werden. Die realisierbaren Wellenlängen liegen dabei für *Signal* zwischen 410 nm und 709 nm und für *Idler* zwischen 710 nm und

---

<sup>36</sup> Lithiumtriborat

2500 nm. Die so erzeugten Laserpulse besitzen eine mittlere Pulsdauer von 20 ns. Über eine Frequenzverdopplung in einem zweiten BBO-Kristall können Wellenlängen im UV-Bereich erreicht werden.

### 3.2.2 Experimenteller Aufbau

Der schematische Aufbau des Blitzlichtphotolyse-Experiments ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Anregung der Probe erfolgt über den durch den Nd:YAG-Laser in Kombination mit dem OPO generierten Anregungspuls. Da die Repetitionsrate des Lasers standardmäßig auf 10 Hz eingestellt ist, ist vor der Probe ein zusätzlicher *Shutter* eingebaut, der die Pulsdauer reduzieren kann. Als Detektionslicht wird das Weißlicht einer Xe-Blitzlichtlampe (Hamamatsu 60 W L7685) eingesetzt. Ihr Spektrum liegt zwischen 190 nm und 2000 nm mit einer Pulsdauer von 3  $\mu$ s und einer Repetitionsrate von maximal 100 Hz. Vor dem Durchgang durch die Probe wird das Weißlicht geteilt, so dass nur ein Teil durch die Probe geht und der andere als Referenz direkt auf den Detektor geleitet wird. Zur Detektion wird eine ICCD<sup>37</sup>-Kamera PI-MAX 3 (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) mit einer Sensorfläche aus 1024 x 256 Pixeln verwendet. Die spektrale Auflösung der Kamera beträgt 0,56 nm mit einer Ausleserate von 2 MHz.

Die Datenerfassung erfolgt über die Detektion der Intensitätsverteilung des Weißlichts vor und nach der Probe ( $I_{vor}, I_{nach}$ ). Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wird zusätzlich eine Referenzmessung durch die Probe ohne Anregungspuls ( $I_{vor}^{ref}, I_{nach}^{ref}$ ) durchgeführt. Aus diesen zwei Wertepaaren kann nun die Absorptionsänderung zum Zeitpunkt  $t$  berechnet werden:

$$\Delta A = -\log \frac{I_{nach} \cdot I_{vor}^{ref}}{I_{vor} \cdot I_{nach}^{ref}} \quad (24)$$

<sup>37</sup> Intensified Charge-Coupled Device (eng.)



### 3 EXPERIMENTELLER AUFBAU

---

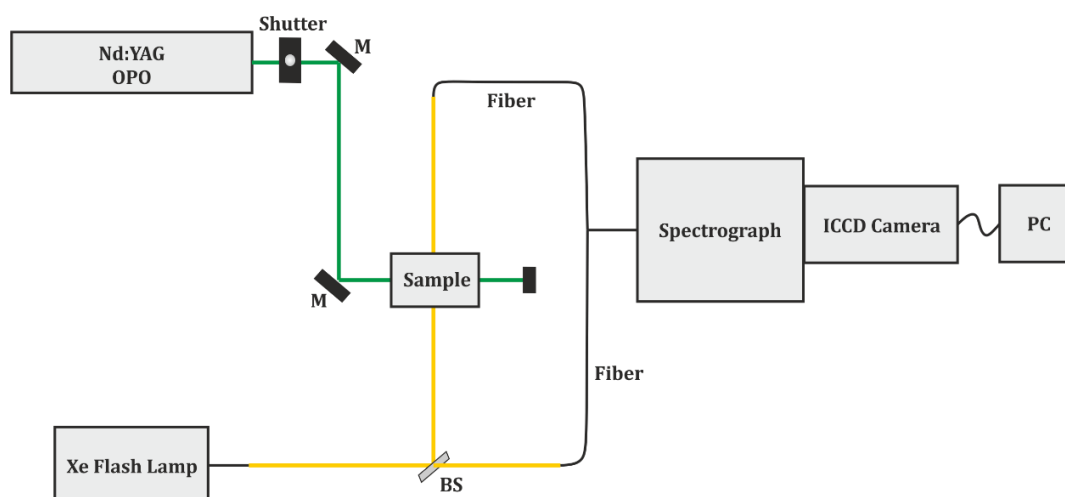


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Blitzlichtphotolyse-Experiments. M: Spiegel, BS: Strahlenteiler.





## 4 Channelrhodopsin-2

### 4.1 Einleitung

Channelrhodopsin-2 (ChR-2) ist ein lichtabhängiger Ionenkanal, der im Augenfleck der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* vorkommt. In seiner natürlichen Umgebung steuert dieser Photorezeptor zusammen mit ChR-1 die lichtabhängige Bewegung der Alge (Phototaxis), indem es bei Lichteinstrahlung durch eine Kanalöffnung zu einer passiven Leitung von Kationen durch das Protein kommt, und verhindert dadurch eine Schädigung des Einzellers durch einen Lichtüberschuss.[20–23,26,62] Die Eigenschaft, nach Lichtaktivierung eine Depolarisation der Zellmembran zu verursachen, macht ChR-2 zu einem wichtigen Werkzeug in einem relativ neuen Feld der Neurophysiologie, der Optogenetik.[29,31,32,63]

Channelrhodopsin-2 gehört zur Familie der mikrobiellen Rhodopsine (Typ I-Rhodopsine) und besteht aus sieben Transmembranhelices mit einem über eine Schiff-Base an einen Lysin-Rest (K257) kovalent gebundenen Retinal als Chromophor. Im dunkel-adaptierten Zustand liegt das Retinal zu 100% in der *all-trans*-Konformation vor.[64] Nach einer Anregung mit grünem Licht isomerisiert der Chromophor jedoch innerhalb weniger Pikosekunden und es bildet sich das 13-*cis*-Isomer als erstes Photoprodukt. Diese erste Photoreaktion setzt den so genannten Photozyklus in Gang, bei dem Konformationsänderungen sowie (De)protonierungsreaktionen im Protein stattfinden. Die während der Photoreaktion gebildeten Intermediate unterscheiden sich somit sowohl in der Proteinstruktur und dem Protonierungszustand der einzelnen Aminosäurereste als auch im Absorptionsverhalten des Chromophors, sodass sie mit Hilfe spektroskopischer Methoden detektiert und charakterisiert werden können.[65–69] Die schematische Darstellung des Photozyklus ist in Abbildung 9 A zu sehen. Das erste Intermediat  $P_1^{500}$  ist das Produkt der Isomerisierungsreaktion und enthält

---

das Retinal in seiner 13-*cis*-Konformation. Beim Übergang zu  $P_2^{390}$ , der mit einer starken Blauverschiebung des Absorptionsspektrums verbunden ist, findet die Deprotonierung der Schiff-Base statt, während das Proton an den Protonenakzeptor D253 abgegeben wird.[65] Blitzlichtphotolyse-Messungen zeigen einen biexponentiellen Zerfall der  $P_2^{390}$ -Absorption, sodass von zwei  $P_2$ -Intermediaten ausgegangen werden kann.[68] Im nächsten Schritt findet die Reprotonierung des Retinals durch D156 unter Bildung des  $P_3^{520}$ - Zustands statt.[65,70] Anschließend erfolgt die Reisoomerisierung des Chromophors zu *all-trans* ( $P_4^{480}$ ) sowie (De)protonierungsreaktionen der an dem Photozyklus beteiligten Seitenketten, sodass das Protein zum Dunkelzustand  $D^{470}$  zurückkehrt. Aufgrund der Tatsache, dass der Ablauf des Photozyklus von ChR-2 den Photozyklen mikrobieller Protonenpumpen wie Bacteriorhodopsin oder Proteorhodopsin sehr ähnelt und durch pH-Indikator-Experimente ein Protonentransport nach Lichtaktivierung festgestellt werden konnte, wird ChR-2 in der Literatur als „undichte“ Protonenpumpe („*leaky*“ *proton pump*) bezeichnet.[71,72] Was ChR-2 allerdings von klassischen Protonenpumpen unterscheidet, ist seine Kanalaktivität, die auch die Hauptfunktion des Proteins darstellt.[26] Nach Lichtanregung ist ChR-2 permeabel für mono- und divalente Kationen wie  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$ , wobei die Permeabilität divalenter Kationen um das 10-100-fache geringer ist.[26,28,73] Der offene Kanal wird assoziiert mit dem Intermediat  $P_3^{520}$ . Die Öffnung selbst erfolgt allerdings wesentlich schneller (200  $\mu s$ ) als die  $P_3^{520}$ -Bildung, sodass keine direkte Verknüpfung der beiden Vorgänge festgestellt werden konnte. Es ist sogar möglich, dass sich der Kanal beim Übergang zwischen zwei  $P_2^{390}$ -Zuständen öffnet.[70,74] Dennoch ist die komplette Entkopplung der Kanalaktivität vom Photozyklus sehr schwierig. Untersuchungen an den Mutanten D156A und C128T, die einen langlebigen offenen Kanal besitzen, zeigen, dass bei diesen Proben gleichzeitig langlebige  $P_2^{390}$ - und  $P_3^{520}$ -Intermediate detektiert werden können.[75,76] Somit bleibt der Öffnungs- und Schließmechanismus des Kanals bis heute Gegenstand der Forschung.[77]

Eine der größten Herausforderungen der Forschungsarbeit der letzten Jahre bestand darin, dass die Kristallstruktur von ChR-2 noch nicht aufgeklärt werden konnte. Die meisten der seit 2012 erschienenen Publikationen, die sich mit der Funktion des Channelrhodopsins-2 beschäftigen, basieren daher auf der Kristallstruktur des zusammengesetzten Proteins aus ChR-1 und ChR-2 (C1C2-Chimäre).[78] Da das chimäre Protein lediglich zwei Helices (F und G) von ChR-2 enthält und die Kristallstruktur nicht alle dieses Protein betreffenden Fragen ausreichend beantworten konnte, wurden die kristallografischen Untersuchungen durch *MD*<sup>38</sup>- und *QM/MM*<sup>39</sup>-Simulationen von ChR-2 ergänzt.[79,80] Der Ausschnitt aus der Kristallstruktur ist in Abbildung 9 B dargestellt. Dabei wurde die Nummerierung der dargestellten Aminosäurereste an das ChR-2 angepasst.

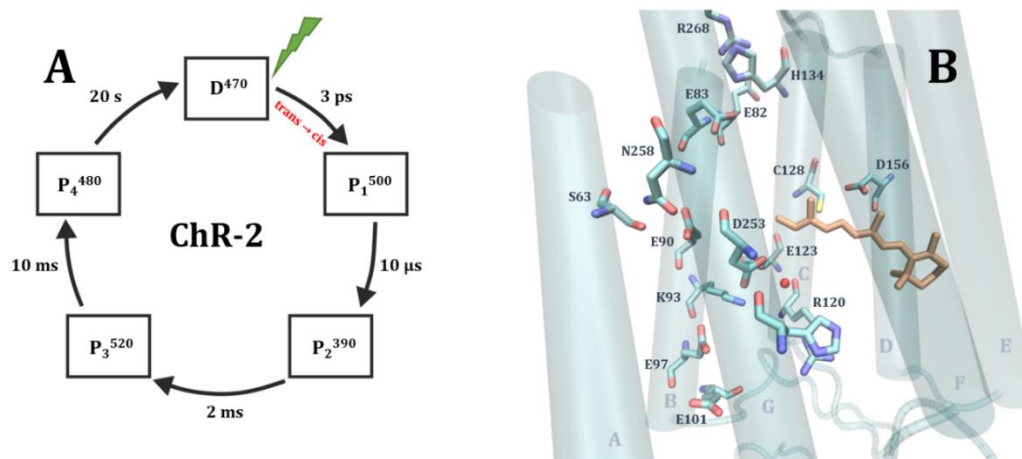


Abbildung 9: (A) Schematische Darstellung des Photozyklus von ChR-2. (B) Darstellung der Retinalumgebung, basierend auf der Kristallstruktur der C1C2-Chimäre (3UG9).[78]

Die Residuen D253 und E123 bilden Gegenionen zur Schiff-Base, wobei die Rolle des primären Protonenakzeptors dem Aspartat-Rest zugeschrieben wird.[65] Das so genannte *DC gate* bilden die Aminosäurereste D156 und C128. Wie bereits erwähnt führen Veränderungen an diesen Stellen zu einer enormen Verlängerung des leitenden Zustandes des Proteins (z.B. das  $\sim 200$ -fache für die

<sup>38</sup> Molecular Dynamics (eng.)

<sup>39</sup> Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (eng.)

C128T-Mutante und das  $\sim 10^4$ -fache für die D156A-Mutante).[75,77,81] Da die Kristallstruktur allerdings einen relativ großen S-O-Abstand von 4,4 Å offenbart und die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung dadurch sehr schwierig ist, wurde die Funktionsweise des *DC gates* bis heute kontrovers diskutiert.[75,80,82,83] Zwischen den Helices A, B, C und D ist ein Hohlraum zu erkennen. Er besteht zum größten Teil aus polaren Glutamat-Resten der Helix B (E82, E83, E90, E97 und E101) und bildet der Literatur nach den Weg für die Kationen nach der Kanalöffnung. Veränderungen an diesen Stellen führen zu enormen Beeinträchtigungen der Ionenselektivität und haben Einfluss auf die Ausbildung der Pore. Dem Glutamat-Rest E90, welcher im dunklen Zustand protoniert vorliegt, wird sogar die zentrale Rolle bei der Initiierung der Kanalöffnung direkt nach der Retinalisomerisierung (*pre-gating*) zugeschrieben.[77,78,84–87] Während diese Behauptung kontrovers diskutiert wird, ist der Einfluss von E90 auf die Ionenselektivität unumstritten. So konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Glutamat-Restes an der Stelle 90 im ChR-2 durch einen positiv geladenen Rest zu einer Permeabilität des Proteins für Chlorid-Ionen führt.[87] Die E/A-Mutation an der Stelle 97 verursacht wiederum den kompletten Verlust der Kanalfunktion des Proteins.[84] Doch auch außer den Glutamat-Resten der Helix B existieren noch weitere Residuen, deren Austausch die Kanalaktivität beeinträchtigt. So konnten bei elektrophysiologischen Studien an den Mutanten H265R, H134D, D253N sowie R120A keine signifikanten Photoströme nachgewiesen werden.[65,77–79,84,88] Der Grund hierfür ist allerdings noch unklar.

Kurz vor Fertigstellung dieser Dissertation wurde von Volkov et al. eine Kristallstruktur von Channelrhodopsin-2 mit einer Auflösung von 4 Å (hexagonaler Kristall) und 2,39 Å (stabförmiger Kristall) publiziert.[89] Diese Struktur unterscheidet sich signifikant von der Kristallstruktur der C1C2-Chimäre.[78] Die für diese Arbeit relevanten Punkte können wie folgt zusammengefasst werden:

Die Kristallstruktur von ChR-2 offenbart im Gegensatz zum zusammengesetzten Protein zwei Hohlräume EC1 (*extracellular cavity 1*) und EC2 (*extracellular*

*cavity* 2). Sie werden getrennt durch das *extracellular gate* ECG mit dem Aminosäurerest R120 im Zentrum. Im intrazellulären Raum existiert ein zusätzlicher großer Hohlraum IC1 (*intracellular cavity* 1), umgeben von den Residuen Y70, E83, E82, K257 und N258. EC2 und IC1 werden getrennt durch ein *inner gate* IG, bestehend aus den Aminosäureresten S63, E90, D253 und N258. Ein weiteres *gate* ICG (*intracellular gate*) trennt die beiden intrazellulären Hohlräume IC1 und IC2 voneinander und besteht aus Y70, E82, E83, H134, H265 und R268. Außerdem zeigt die Struktur eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Residuen D156 und C128 (*DC gate*) über ein Wassermolekül (w5). Der Gegenionenkomplex besteht aus den Aminosäureresten E123 und D253, die in direktem Kontakt zu der protonierten Schiff-Base des Chromophors stehen (die Sauerstoffatome sind 2,8 Å und 3,2 Å von der Schiff-Base entfernt). Insgesamt bringt die Struktur ein großes Wasserstoffbrückennetzwerk hervor, welches den Gegenionenkomplex mit weiteren Resten wie E90, K93, E97, W124, T127, P227 und R120 verbindet. Die Autoren stellen außerdem einen möglichen Mechanismus der Kanalöffnung vor, der auf folgender Behauptung basiert: Ionen passieren die Hohlräume, wenn alle drei *gates* offen sind. Dabei wird R120, D253 und E90 eine zentrale Rolle bei diesem Vorgang zugeschrieben. So führen die Isomerisierung des Retinals und die darauffolgende Protonaufnahme durch D253 zur Auflösung des bestehenden Wasserstoffbrückennetzwerks, welches sich bis zu E90 und R120 erstreckt. Dies löst eine Neuordnung der Residuen E90, R120 und D253 aus und initiiert somit die Öffnung des *inner gates* IG. Dieser Mechanismusborschlag erklärt die fehlende Kanalaktivität der Mutanten R120A und D253N, doch seine Verifizierung erfordert weitere wissenschaftliche Studien.

Das vorliegende Kapitel 0 beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit die Hauptfunktion des Retinalproteins Channelrhodopsin-2, nämlich die Kanalaktivität, mit dem so genannten Photozyklus und dem Protonenpumpmechanismus zusammenhängt, und wie diese beiden Prozesse von der Isomerisierung des Chromophors beeinflusst und angetrieben werden. Zunächst wird die Proteinantwort auf die Retinalisomerisierung direkt nach der

Lichtanregung analysiert, indem die Ergebnisse der Kurzzeit-IR-Spektroskopie im Bereich der Carbonylschwingungen der benachbarten Aminosäurereste dargestellt werden. Des Weiteren werden Untersuchungen der Primärreaktion und des Photozyklus der R120H-Variante des ChR-2 vorgestellt, die ebenso wie die oben erwähnte R120A-Mutante keine Kanalaktivität zeigt.[88] Abschließend befasst sich das Kapitel mit dem spektroskopischen Verhalten von ChR-2 mit einem modifizierten Chromophor, bei dem die lichtinduzierte Isomerisierung durch einen eingebauten Phenyl-Ring gehemmt ist.[90]

## 4.2 Kurzzeit-IR-Spektroskopie im Bereich der Carbonylschwingungen der Proteinseitenketten

Obwohl Channelrhodopsin-2 bereits zur Steuerung lebender Organismen erfolgreich eingesetzt wird,[31] ist seine Funktionsweise noch nicht ausreichend erforscht. So bleibt nach wie vor die Frage, welche Prozesse die Öffnung des Kanals und somit die Leitung der Kationen auslösen und beeinflussen. Die zur Aufklärung dieser Fragestellung häufig verwendete und etablierte Methode ist die zeitaufgelöste Infrarot-Spektroskopie. Mit ihrer Hilfe konnte bereits gezeigt werden, dass die Kanalaktivität von zahlreichen Veränderungen in der Retinalumgebung begleitet wird. Diese Veränderungen sind beispielsweise die Protonierungszustände spezifischer Seitenketten und insbesondere konformationelle Änderungen innerhalb des Proteinrückgrats, die deutlich in der Amid I- Differenzbande bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  sichtbar sind.[65,69,77] Diese Bande umfasst hauptsächlich die C=O-Streckschwingungen des Proteinrückgrats[91] und konnte im Falle von ChR-2 bereits vor der Kanalöffnung im Differenzspektrum des  $P_1$ -Intermediats bei 80 K detektiert werden.[66,67,83] Ergebnisse der *pump-probe*-Spektroskopie in diesem Spektralbereich zeigen den Aufbau dieser Bande mit einer Zeitkonstante von 500 fs,[69] was für mikrobielle Retinalproteine außergewöhnlich schnell ist.[92,93] Der schnelle Aufbau sowie der konstante Verlauf des Signals innerhalb der ersten Nanosekunde nach der Retinalanregung deuten auf einen sehr schnellen und effektiven Energietransfer vom Retinal auf das Proteinrückgrat während der Isomerisierungsreaktion hin, der die Öffnung des Kanals vorbereitet (*pre-gating state*).[69,77]

Im Folgenden werden die Ergebnisse der *vis-pump-IR-probe*-Spektroskopie an ChR-2 im Bereich der Schwingungsbanden protonierter Glutamat- und Aspartat-Reste dargestellt. Dabei soll insbesondere auf die Bildungsdynamik der Differenzbanden in diesem Spektralbereich eingegangen und in Anlehnung an die Literatur eine Bandenzuordnung der für die Funktion des Proteins wichtigen Aminosäurereste vorgenommen werden. So soll festgestellt werden,



welchen Effekt die Isomerisierung des Chromophors auf seine Umgebung hat und welche Prozesse die Kanalöffnung vorbereiten.

Die dargestellten Ergebnisse sind ein Teil des folgenden Manuskripts, das aktuell in Vorbereitung ist:

E. Bühl, P. Eberhardt, E. Bamberg, C. Bamann, J. Wachtveitl, Ultrafast protein response in channelrhodopsin-2 studied by time-resolved IR spectroscopy, in preparation.

#### 4.2.1 Probenpräparation und Experimentelles

Für die **transienten Absorptionsmessungen im IR-Bereich** wurde eine solubilisierte ChR-2 Probe, bereitgestellt von Christian Bamann (AG Bamberg, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main), [75] verwendet. Um die hohe Absorption des Wassers im verwendeten Messbereich zu vermeiden, wurde die Probe in einen D<sub>2</sub>O-Puffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1 % DM) mit einem pD-Wert von 7,4 gebracht und anschließend unter Verwendung von Zentrifugalfiltration (Centriprep, 50 kD cut-off, Millipore) aufkonzentriert. Die Konzentration wurde in einer CaF<sub>2</sub>-Küvette mit einer Schichtdicke von 50 µm auf eine optische Dichte von etwa 0,12 bei 450 nm eingestellt. Der für die Messungen verwendete Aufbau ist in 3.1.4 beschrieben. Dabei wurde die Probe mit Hilfe eines Clark MXR-CPA-2001 Lasersystems (Horiba Jobin Yvon GmbH, Bensheim) mit einem Laserpuls der Wellenlänge von 480 nm (NOPA) und einer Pulsenergie von ~300 nJ angeregt und zwischen 1685 cm<sup>-1</sup> und 1777 cm<sup>-1</sup> abgetastet. Da im Bereich des Zeitnullpunkts die Daten vom Signal der Kreuzphasenmodulation dominiert werden, wurde die Messung ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps ausgewertet. Außerdem wurden die Randkanäle aufgrund eines schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses in der Auswertung nicht berücksichtigt. Anschließend wurden die Daten mit der Summe aus drei exponentiellen Fit-Funktionen unter Verwendung des Analyseprogramms z20 (LMU München) angepasst.

## 4.2.2 Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen im IR-Bereich

Die transienten Absorptionsspektren im Bereich von  $1687\text{ cm}^{-1}$  bis  $1770\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 10 zeigen zusammenfassend das Messergebnis vor und nach der globalen Fit-Analyse.

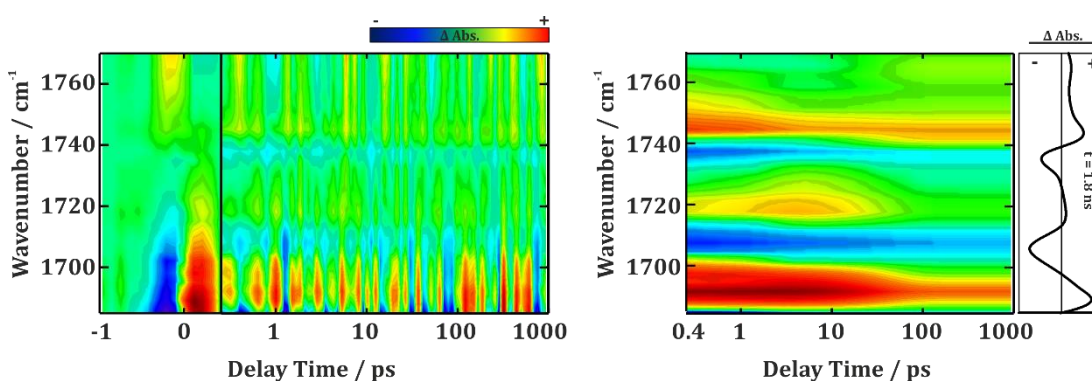


Abbildung 10: Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 nach Photoanregung bei 480 nm (links) und der dazugehörige Fit (rechts). Das Spektrum ist farbkodiert: rot stellt positive, blau negative und grün keine Absorptionsänderung dar. Die Zeitachse ist bis zu einer Verzögerungszeit von 1 ps linear und danach logarithmisch dargestellt. In der linken Abbildung besitzen die Zeitbereiche vor und nach 0,4 ps jeweils einen eigenen Farbcode. Die gleich skalierte Darstellung befindet sich zusätzlich im Anhang. In der rechten Abbildung ist rechts die Absorptionsänderung am Ende der Messzeit abgebildet.

Aus dem Farbplot wird deutlich, dass die spektrale Signatur bei  $t = 1,8\text{ ns}$  bis auf kleine Abweichungen bereits nach 400 fs detektiert werden kann. Die detektierten Signale verlieren innerhalb der ersten 100 ps an Amplitude und bleiben danach bis zum Ende der Messzeit konstant. Durch die globale Fit-Analyse konnten 3 Zerfallszeiten ermittelt werden. Die entsprechenden Fit-Amplituden sind in Abbildung 11 A dargestellt. Die Zeitkonstante  $\tau_1 = (1,5 \pm 1,0)\text{ ps}$  weist aufgrund eines schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses einen großen Fehler auf, was die Interpretation des Amplitudenspektrums erheblich erschwert. Die Zeitkonstante  $\tau_2 = (30 \pm 5)\text{ ps}$  beschreibt hauptsächlich einen leichten Rückgang der positiven und negativen Differenzbanden aufgrund der durch die Energieabgabe an die Umgebung verursachten Kühlprozesse. Die letzte Zeitkomponente modelliert das Signal bei

sehr langen Verzögerungszeiten. Somit entspricht das Amplitudenspektrum von  $\tau_3$  dem Differenzspektrum am Ende der Messung ( $t = 1,8$  ns).

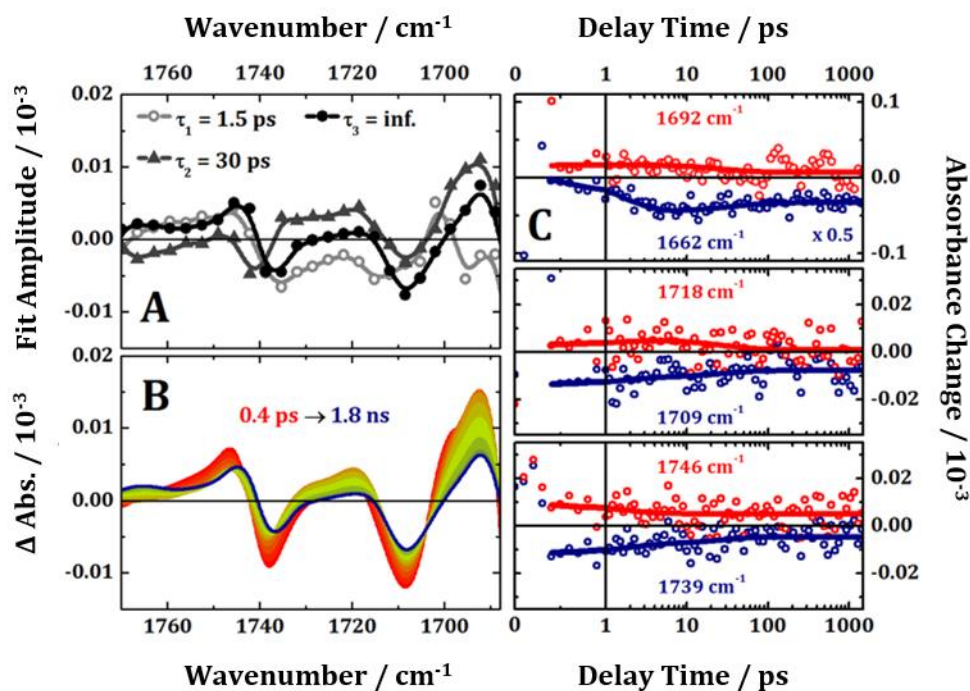


Abbildung 11: A) Amplitudenspektren der globalen Fit-Analyse von ChR-2. B) Transiente Absorptionsspektren von ChR-2 (Fit) zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,4 ps und 1,8 ns. C) Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 zu ausgewählten Wellenzahlen. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den dazugehörigen Fit. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch aufgetragen. Die Transiente bei 1662 cm<sup>-1</sup> ist der Publikation [69] entnommen.

Die spektrale Lage sowie die zeitliche Änderung der IR-Signale sind gut in den Differenzspektren zu verschiedenen Verzögerungszeiten in Abbildung 11 B zu erkennen. Die Einzeltransienten zu ausgewählten Messwellenlängen sind in Abbildung 11 C dargestellt. Bei (+)1690 cm<sup>-1</sup> erkennt man ein dominantes positives Signal mit einer kleinen Schulter bei (+)1700 cm<sup>-1</sup> bei kurzen Verzögerungszeiten. Wie alle anderen in diesem Bereich detektierten Signale bildet sich diese Bande auf einer sub-ps-Zeitskala und kann bereits nach 400 fs detektiert werden. Nach einem leichten, durch Kühlprozesse induzierten Rückgang mit  $\tau_2 = 30$  ps zeigt die Bande einen konstanten Offset von  $6 \times 10^{-6}$  OD am Ende der Messzeit. Eine ähnliche Amplitude mit umgekehrtem Vorzeichen

im Endspektrum zeigt auch die negative Bande bei  $(-)1708\text{ cm}^{-1}$ . Dazu hypsochrom verschoben findet man ein breites positives Signal mit einem Maximum bei  $(+)1718\text{ cm}^{-1}$ , welches nach 100 ps nur eine sehr kleine Amplitude aufweist. Die Form der Bande lässt eine Überlagerung mehrerer Signale vermuten. Eine ähnliche Überlagerung verschiedener Differenzsignale findet man auch am „blauen“ Ende der Spektren. Das Endspektrum zeigt in diesem Bereich ein breites positives Signal mit einem Maximum bei ca.  $(+)1766\text{ cm}^{-1}$ . Die Differenzbande bei  $(+)1746/(-)1738\text{ cm}^{-1}$ , die bei einer Verzögerungszeit von 400 fs bereits vorhanden ist, verliert ähnlich zum Signal bei  $(-)1709\text{ cm}^{-1}$  an Amplitude mit zwei Zeitkonstanten  $\tau_1 = 1,5\text{ ps}$  und  $\tau_2 = 30\text{ ps}$ . Die  $\tau_2$  Zeitkomponente beschreibt dabei zusätzlich eine leichte bathochrome Verschiebung der Signale um  $\sim 2\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.2.3 Bandenzuordnung

Zur Abschätzung der tatsächlichen spektralen Lage der detektierten Differenzbanden wurde als erste Näherung die zweite Ableitung des Spektrums nach einer Verzögerungszeit von 1,8 ns, welches das Spektrum des  $P_1$ -Intermediates darstellt, gebildet. Anschließend wurde das Spektrum im Spektralbereich von  $1687\text{ cm}^{-1}$  bis  $1770\text{ cm}^{-1}$  mit 11 Gauß-Funktionen angepasst. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt. Wie bereits erwähnt zeigt das  $P_1$ -Spektrum eine Differenzbande bei etwa  $(+)1744/(-)1736\text{ cm}^{-1}$ . Diese Bande setzt sich aus einem positiven und einem negativen Anteil mit ähnlicher Amplitude und Maxima bei  $1742\text{ cm}^{-1}$  und  $1738\text{ cm}^{-1}$  zusammen. Diese spektrale Signatur wurde bereits nach Belichtung von ChR-2 bei 80 K detektiert und den Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk der Carbonylgruppe von D156 zugeordnet.[66,67,69,83] Transiente Absorptionmessungen mit einer Zeitauflösung im Nanosekundenbereich offenbaren im  $P_1$ -Zustand ebenfalls eine ähnliche Bande,[94] die nach einem  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ - Austausch lediglich eine leichte Verschiebung der negativen

Komponente von  $1736\text{ cm}^{-1}$  zu  $1738\text{ cm}^{-1}$  zeigt.[95] Durch Experimente an D156E- und D156A-Mutanten konnte diese Differenzbande ebenfalls der Verschiebung der Carbonylstreckschwingung durch Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk von D156 im  $P_1$ -Intermediat zugeordnet werden.[65,95] Außerdem wurde eine zusätzliche breite positive Bande von D156 bei  $1765\text{ cm}^{-1}$  im späten  $P_1$ -Zustand detektiert,[65,96] deren Maximum sich in  $D_2O$  zu  $1756\text{ cm}^{-1}$  verschiebt.[95] Bei den hier vorgestellten Messungen liefert die Gauß-Anpassung in diesem Bereich zwei schwache positive Signale mit Maxima bei  $1750\text{ cm}^{-1}$  und  $1766\text{ cm}^{-1}$ , wobei letzteres erst mit der langsamen Zeitkonstante  $\tau_2$  von 30 ps aufgebaut wird.

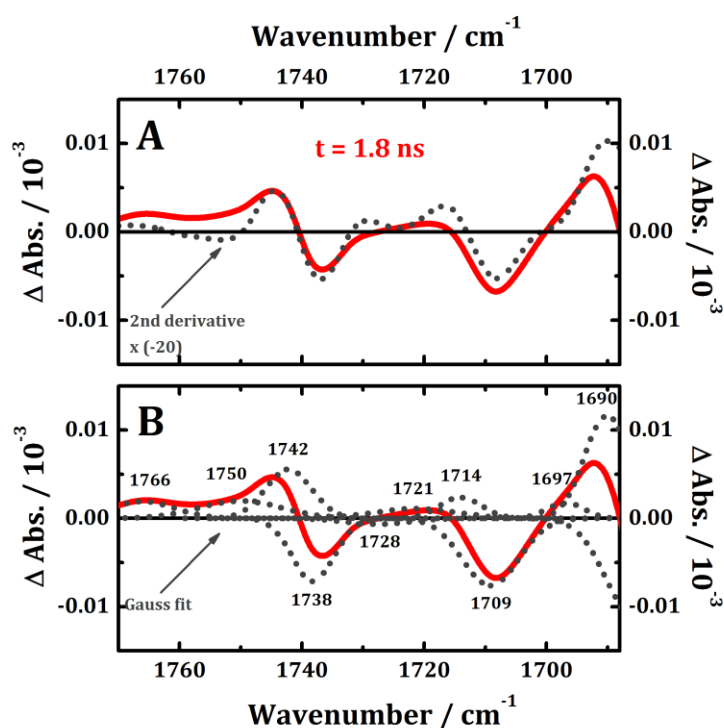


Abbildung 12: A) Absorptionsänderung nach einer Verzögerungszeit von 1,8 ns (rot) und seine zweite Ableitung (grau, gepunktet). B) Absorptionsänderung nach einer Verzögerungszeit von 1,8 ns (rot) mit 11 angepassten Gauß-Funktionen (grau, gepunktet).

Ziemlich eindeutig ist in der Literatur die Zuordnung des negativen Signals bei  $1709\text{ cm}^{-1}$ , welches in  $H_2O$  bei  $1718\text{ cm}^{-1}$  zu finden ist.[94,95] Diese wird dem protonierten Aminosäurerest E90, welcher für die Kationenselektivität

verantwortlich zu sein scheint, zugeordnet.[67,85,87] Da diese Bande sowohl im Differenzspektrum bei 80 K als auch bei zeitaufgelösten Messmethoden im Nanosekundenbereich bereits zu Anfang der Messung eine nicht zu vernachlässigende Amplitude besitzt, wird kontrovers diskutiert, ob es sich zu diesen früheren Zeiten lediglich um eine Änderung im Wasserstoffbrückennetzwerk von E90 handelt, oder ob diese Aminosäure schon im P<sub>1</sub> deprotoniert vorliegt. Im ersten Fall wird von einer Verschiebung dieser Bande zu 1728 cm<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O bzw. zu 1724 cm<sup>-1</sup> in D<sub>2</sub>O berichtet.[65,95] Bei Kuhne et al. wird auf eine andere Dynamik bei (+)1728 cm<sup>-1</sup> hingewiesen und eine frühe Deprotonierung von E90 als Startpunkt der Kanalöffnung postuliert.[94] Das hier aufgenommene Differenzspektrum des P<sub>1</sub>-Intermediats zeigt ein negatives Signal bei (-)1709 cm<sup>-1</sup> in D<sub>2</sub>O, passend zu den Literaturangaben. Es ist deswegen davon auszugehen, dass diese Absorptionsänderung durch E90 verursacht wird. Die Form der dazu um 9 cm<sup>-1</sup> zu höheren Energien verschobenen positiven Bande lässt eine Überlagerung von positiven und negativen Beiträgen vermuten. Die Anpassung mit Gauß-Funktionen in diesem Spektralbereich liefert zwei positive Beiträge bei 1714 cm<sup>-1</sup> und 1721 cm<sup>-1</sup> und eine negative Bande bei 1728 cm<sup>-1</sup>. Da diese Auswertungsmethode lediglich eine Näherung darstellt, ist die Ermittlung der tatsächlichen Anzahl der beteiligten Signale, der genauen Bandenpositionen und somit eine eindeutige Bandenzuordnung äußerst schwierig.

Das intensivste Signal im P<sub>1</sub>-Spektrum stellt die Bande bei 1692 cm<sup>-1</sup> (1690 cm<sup>-1</sup> nach Gauß-Anpassung) dar. Diese besitzt eine kleine Schulter bei ca. 1700 cm<sup>-1</sup>, die bei 400 fs wesentlich stärker ausgeprägt ist und auf einer schnelleren Zeitskala als die Hauptkomponente zerfällt. Das bei 80 K aufgenommene FTIR-Spektrum in H<sub>2</sub>O zeigt ebenfalls eine um 5 cm<sup>-1</sup> zu höheren Energien verschobene positive Differenzbande, die ihrer Form nach auch eine Überlagerung verschiedener positiver Signale darstellt.[67,83] Eine eindeutige Zuordnung der Signale existiert in der Literatur allerdings nicht. Basierend auf Mutations-experimenten konnte im P<sub>2</sub>-Intermediat dieses positive Signal

aufgrund der beobachteten Dynamik der Protonierung von D253 zugeordnet werden.[65] Gleichzeitig wurde von anderen Gruppen das D253-Signal im  $P_2$  der positiven Bande bei  $1728\text{ cm}^{-1}$  zugeschrieben. Da auf der von uns gemessenen Zeitskala der Protonenakzeptor D253 deprotoniert vorliegt,[78,80] ist auch kein Signal dieser Aminosäure im untersuchten Spektralbereich zu erwarten.

#### 4.2.4 Diskussion

Die Kurzzeit-IR-Messungen an ChR-2 im Bereich der Carbonylstreckschwingungen protonierter Aspartat- und Glutamat-Reste zeigen, dass schon 400 fs nach der Anregung eine Vielzahl an Differenzbanden detektiert werden kann. Die spektrale Signatur nach dieser kurzen Verzögerungszeit spiegelt bereits das bei 80 K aufgenommene Spektrum des  $P_1$ -Intermediates wider.[66,67,69,83] Basierend auf der Bandenzuordnung des Tieftemperatur-spektrums konnten einige Differenzsignale einzelnen Aminosäureresten im Protein zugeordnet werden. So entspricht die Differenzbande bei  $(+)$ 1742/ $(-)$ 1738  $\text{cm}^{-1}$  (nach Gauß-Anpassung) Änderungen der C=O-Schwingungs-frequenz des protonierten Aspartats an der Stelle 156. Dieser Aminosäurerest befindet sich in der Helix D [78] und gehört zusammen mit C128 zu dem so genannten „DC gate“.[83] Der Austausch einer dieser beiden Aminosäuren durch z.B. ein Asparagin im Falle von D156 oder ein Threonin im Falle von C128 führt zu einer  $10^2$ - bis  $10^5$ -fachen Verlangsamung der Kanalschließung.[75,81] Trotz einer sehr kleinen Verschiebung (etwa  $2\text{ cm}^{-1}$ ) der Bande unter H/D-Austausch wird D156 die Rolle des Protonendonors zugeschrieben.[65,95] Die Lage der Grundzustandsbande in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $1738\text{ cm}^{-1}$  spricht für eine Carboxylgruppe mit einer Wasserstoffbrücke.[97] Die Verschiebung dieses Signals zu  $1742\text{ cm}^{-1}$  direkt nach der Anregung zeigt eine Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung und somit Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk von D156 während der Retinalisomerisierung.

Eine weitere negative Bande bei  $1709\text{ cm}^{-1}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  konnte dem Glutamat-Rest in Position 90 zugeordnet werden. Dieser Aminosäurerest befindet sich in Helix B und steht in Kontakt zu N258 und S63.[78,89] Wie bereits erwähnt wird in der Literatur kontrovers diskutiert, zu welchem Zeitpunkt nach der Anregung E90 deprotoniert wird.[65,85,94,95] Im von uns untersuchten Zeitbereich zeigt diese Bande keine besonders ausgeprägte Dynamik. Ihre Bildung ist nach 400 fs bereits abgeschlossen und es ist eine leichte Amplitudenabnahme mit den Zeitkonstanten  $\tau_1 = 1,5\text{ ps}$  und  $\tau_2 = 30\text{ ps}$  zu beobachten. Eine durch Kühlprozesse verursachte spektrale Verschiebung der Bande ist nicht zu erkennen, was für einen sehr effektiven Energietransfer vom angeregten Retinal zu E90 spricht. Insgesamt ist die Dynamik der Bande bei  $1709\text{ cm}^{-1}$  der bei  $1738\text{ cm}^{-1}$ , die der C=O-Grundzustandsstrettschwingung von D156 zugeordnet ist, sehr ähnlich. Die schnelle Bildung und der zeitliche Verlauf dieser Bande bringen die Erkenntnis, dass es nach der Retinalanregung zu einer Änderung im Wasserstoffbrücken-netzwerk von E90 kommt und dass keine Deprotonierung von diesem Aminosäurerest innerhalb des beobachteten Zeitraumes stattfindet. Die genaue Verschiebung der Schwingungsfrequenz durch diese Änderung in der Umgebung von E90 lässt sich leider nicht feststellen, da es oberhalb des negativen Signals zu einer Überlagerung von positiven und negativen Differenzsignalen kommt. Somit zeigt der positive Beitrag bei  $1718\text{ cm}^{-1}$  eine andere Dynamik im untersuchten Zeitbereich, was auch auf eine Überlagerung unterschiedlicher IR-Signale zurückgeführt werden kann.

Beim Vergleich der  $P_1$ -Differenzspektren von ChR-2 im untersuchten Spektralbereich mit anderen mikrobiellen Retinalproteinen lassen sich deutliche Unterschiede feststellen. Während im Differenzspektrum bei 77 K von *Anabena* sensory rhodopsin (ASR) keine Signale detektiert werden konnten,[98] zeigt das K-Differenzspektrum von Bacteriorhodopsin (BR) eine Differenzbande bei

(-)1740/(+)1733  $\text{cm}^{-1}$ , welche auf D115 zurückgeführt wurde.[77,99] Eine ähnliche Bande, zugeordnet zu D141, konnte auch für die Chlorid-Pumpe Halorhodopsin (HR) detektiert werden.[100] Im Vergleich zum Signal des



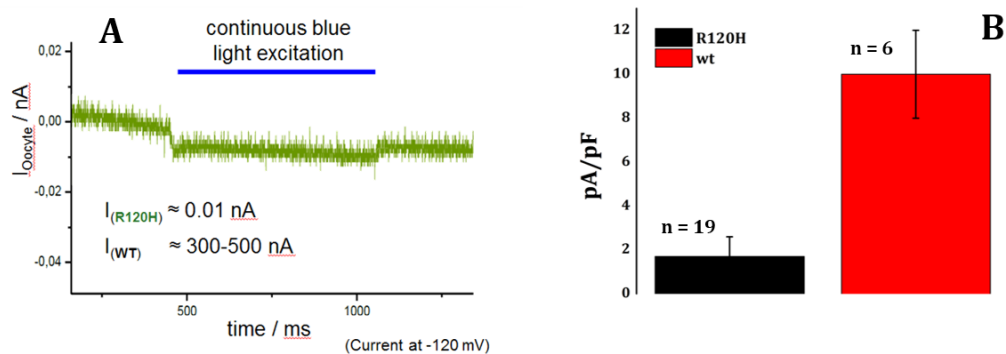
homologen Aminosäurerestes D156 in ChR-2 besitzt diese Differenzbande eine wesentlich kleinere Amplitude und ein umgekehrtes Vorzeichen. In zeitaufgelösten IR-Messungen mit Picosekunden-Zeitauflösung konnte bei BR zwischen 100 ps und 14 ns im Bereich der Absorption der Carboxyl-Seitenketten kein Signal detektiert werden. Diese Tatsache impliziert, dass das Differenzsignal von D115 in BR erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Anregung gebildet wird.[101]

Eine schnelle Bildung der Differenzbanden mit einer nicht vernachlässigbaren Amplitude im Carbonylschwingungsbereich von ChR-2 spricht für einen besonders schnellen Energietransfer innerhalb des Proteins direkt nach der Anregung und eine starke Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und seiner direkten Umgebung. Diese starke Kopplung konnte bereits bei früheren zeitaufgelösten IR-Messungen beobachtet werden.[69] Neben einer intensiven Amid I-Bande bei  $1665\text{ cm}^{-1}$ , die nach der Retinalanregung mit einer Zeitkonstante von 500 fs gebildet wird, konnten zahlreiche Differenzbanden direkt nach dem Zerfall der Kreuzphasenmodulation detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die im Carbonylbereich detektierten Signale nun, wie oben beschrieben, einzelnen Aminosäuren in der Retinalumgebung zugeordnet. Im Gegensatz zur Amid I-Bande, deren Bildung auf der gleichen Zeitskala wie die Retinalisomerisierung stattfindet,[69] ist der Aufbau der C=O-Banden der einzelnen Seitenketten nach dem Zerfall der Kreuzphasenmodulation bereits abgeschlossen. Verhoefen et al. geben für den Zerfall des angeregten Zustands und die Retinalisomerisierung eine Zeitkonstante von 400 fs an. Eine kürzere Zerfallszeit wird zwar ebenso ermittelt, allerdings wird diese der Wellenpaketsbewegung aus der Franck-Condon-Region entlang der Streckkoordinate zugeordnet.[68] Somit werden die detektierten Carbonyl-schwingungen unmittelbar durch die Retinalanregung angesprochen und die Bildung der Differenzbanden findet statt, während sich der Chromophor noch im angeregten Zustand befindet. In diesem Fall wäre eine unmittelbare Nähe der entsprechenden Aminosäurereste zum Retinal denkbar. Bei E90 und D156 ist dies allerdings nicht der Fall und ein direkter

Energietransfer demnach nicht möglich.[78,89] E90 bildet allerdings eine starke Wasserstoffbrücke zu der Seitenkette N258. Da die Differenzbande bei  $1709\text{ cm}^{-1}$  sehr wahrscheinlich durch die Schwächung dieser Bindung verursacht wird, findet der Energietransfer vom Retinal zu E90 über diesen Rest statt. Genau wie das über die Schiff-Base an das Retinal gebundene K257 befindet sich N258 in der Helix G.[78] Das bedeutet, dass die Anregung des Chromophors womöglich zu einer Bewegung von K257 und somit zu einem „Knicken“ der Helix G führt. Dies wiederum verursacht die Schwächung der Kopplung zu benachbarten Helices über die Seitenketten und somit auch die Schwächung der H-Brücke zwischen E90 und N258 sowie auch zwischen N258 und S63 in der Helix A. Im Falle von D156 ist die wahrscheinlichste Verknüpfung dieser Seitenkette zum Retinal die über den Aminosäurerest C128 („*DC gate*“). Der Aminosäurerest C128 steht in Van-der-Waals-Kontakt zum Retinal und wechselwirkt mit dem  $\pi$ -Elektronen-systems des Chromophors.[78,89] Somit hat die Anregung des Retinals einen direkten Einfluss auf C128, von welchem der Energieübertrag über ein wasserstoffgebrücktes Wassermolekül zu D156 stattfindet. Die Tatsache, dass der Energietransfer vom Retinal zu den Aminosäuren in der Umgebung nicht ausschließlich direkt stattfindet und dieser Prozess unerwartet schnell ist, setzt eine sehr starke Wechselwirkung innerhalb des Proteins voraus. Die Geschwindigkeit und die Effizienz der Energieweitergabe sind ungewöhnlich für bekannte mikrobielle Rhodopsine und ermöglichen sehr wahrscheinlich die spätere Kanalöffnung von ChR-2.

### 4.3 Einfluss des Arg-120 auf den Photozyklus, die Retinalisomerisierung und die Kanalfunktion

Die Ergebnisse der Kurzzeitspektroskopie an ChR-2 im IR-Bereich zeigen deutlich, dass die ersten Ereignisse nach der Retinalanregung mit signifikanten Veränderungen der Wasserstoffbrückennetzwerke im Protein einhergehen und somit die Öffnung des Kanals vorbereiten. Um diesen Vorgang besser charakterisieren zu können, werden hier spektroskopische Untersuchungen an der R120H-Mutante dargestellt. Diese Mutante wurde von Dr. Christian Bamann (AG Bamberg, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main) nach dem Vorbild der R159A-Variante der C1C2-Chimäre[78] synthetisiert und für die im Folgenden dargestellten Messungen zur Verfügung gestellt. Die Elektrophysiologie-messungen, durchgeführt in HEK-Zellen unter Dauerbelichtung der Probe, zeigen stark verminderte Photoströme im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: A) TEVC<sup>40</sup>-Aufnahme der R120H-Mutante. B) Transportaktivität der R120H-Mutante (schwarz) verglichen mit dem Wildtyp von ChR-2 (rot). n ist die Anzahl der durchgeführten Versuche.**

Ähnlich zu der R159A-Mutante des chimären Proteins[78] und der R120A-Variante[88] des ChR-2 zeigt die R120H-Mutante keine Kanalaktivität nach der

<sup>40</sup> Two-Electrode Voltage Clamp (eng.)

Anregung des Chromophors. Durch diese Eigenschaft eignet sich die Probe ideal, um im direkten Vergleich mit dem Wildtyp die mit der Kanalöffnung einhergehenden Prozesse genau zu untersuchen. Im Folgenden werden die kurzzeitspektroskopischen Untersuchungen der Primärreaktion der R120H-Mutante sowie der Proteinantwort auf die Retinalanregung dargestellt. Unter Analyse der Blitzlichtphotolyse-Daten wird außerdem der Einfluss der Punktmutation auf den Photozyklus herausgearbeitet und anschließend der Zusammenhang zwischen der Retinalanregung, dem Protonenpumpmechanismus und der Kanalöffnung diskutiert.

Die dargestellten Ergebnisse sind ein Teil der folgenden Publikation, die aktuell in Vorbereitung ist:

E. Bühl, T. Resler, C. Bamann, R. Lam, B. Schulz, R. Schlesinger, E. Bamberg, J. Heberle, J. Wachtveitl, Assessing the role of R120 in the gating of ChR2 by time-resolved IR spectroscopy from femto- to milliseconds, in preparation.

### 4.3.1 Probenpräparation und Experimentelles

Die hier verwendeten Proben wurden von Dr. Christian Bamann bereitgestellt.[75] Für die Messungen im sichtbaren und im UV-Bereich wurden diese in einem HEPES-Puffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1 % DM) mit einem pH-Wert von 7,4 solubilisiert. Für die IR-Experimente wurden die Proben in einen D<sub>2</sub>O-Puffer (pD = 7,4) überführt und anschließend unter Verwendung von Zentrifugalfiltration (Centriprep, 50 kD cut-off, Millipore) aufkonzentriert.

Für die **vis-pump-UV/vis-probe**-Messungen wurde das Clark MXR-CPA-2001 Lasersystem (Horiba Jobin Yvon GmbH, Bensheim) verwendet. Der Messaufbau ist in 3.1.3 beschrieben. Angeregt wurde die Probe mit einem Laserpuls der Wellenlänge von 480 nm (NOPA) und Pulsenergien von ~200 nJ. Für die Abtastung wurde das in einem Saphir-Kristall generierte Weißlicht verwendet. Der Polarisationswinkel zwischen den beiden Pulsen wurde auf 54,7°

(„magischer Winkel“) eingestellt. Die spektrale Auflösung des Experiments betrug 4 nm mit einer zeitlichen Auflösung von  $\sim 150$  fs. Die Konzentration der Probe wurde in einer Quarz-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm auf eine OD von 0,5 bei 450 nm eingestellt. Die Messdaten wurden anschließend mit Hilfe des Analyseprogramms OPTIMUS um die kohärenten Artefakte korrigiert und angepasst.[59] Die Abbildung 15 wurde zusätzlich mit Hilfe des Programms z20 (IDL basiert, LMU München) erstellt.

Die **Blitzlichtphotolyse**-Messungen erfolgten in einer 2 mm x 10 mm Quarzküvette nach einer Anregung der Proben bei 480 nm ( $\sim 2$  mJ/cm<sup>2</sup>). Das Abtastlicht wurde durch eine Xe-Blitzlampe (L7685, Hamamatsu) generiert und anschließend mit Hilfe einer ICCD-Kamera (PI-MAX 3, Princeton Instruments) mit einer Integrationszeit von 333 ns detektiert. Der vollständige Aufbau ist in 3.2 beschrieben. Die Datenauswertung erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms OPTIMUS.[59]

Für die **vis-pump-IR-probe**-Experimente wurde der in 3.1.4 verwendete Aufbau verwendet. Die Proben wurden mit Hilfe eines Clark MXR-CPA-2001 Lasersystems (Horiba Jobin Yvon GmbH, Bensheim) mit einem Laserpuls der Wellenlänge von 480 nm (NOPA) und Pulsenergien von  $\sim 300$  nJ angeregt. Die Abtastung erfolgte im Falle der R120H-Mutante zwischen 1500 cm<sup>-1</sup> und 1684 cm<sup>-1</sup>. Die D253N- sowie die E123T-Probe wurden zwischen 1590 cm<sup>-1</sup> und 1684 cm<sup>-1</sup> abgetastet. Die Konzentration der Proben wurde in einer CaF<sub>2</sub>-Küvette mit einer Schichtdicke von 50  $\mu$ m auf eine optische Dichte von  $\sim 0,1$  bei 450 nm eingestellt. Die Messdaten wurden anschließend ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps mit der Summe aus drei exponentiellen Fit-Funktionen unter Verwendung des Analyseprogramms z20 angepasst.

### 4.3.2 Stationäre Charakterisierung

Abbildung 14 zeigt das Absorptionsspektrum des Retinal-Chromophors des Wildtyps sowie der R120H-Mutante von ChR-2. Beide Spektren weisen eine ausgeprägte Schwingungsfinestruktur mit Maxima bei 413 nm, 445 nm und

478 nm, gut sichtbar durch die zweite Ableitung des Absorptionsspektrums auf. Wie aus den Spektren gut zu erkennen ist, wird weder die spektrale Lage der Maxima noch die Feinstruktur durch die Mutation beeinflusst, was einen direkten Einfluss des Aminosäurerestes in Position 120 auf die elektrostatische Umgebung des Retinals ausschließt.

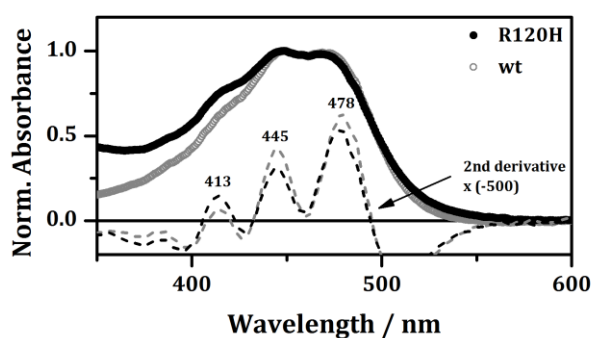


Abbildung 14: Statische Absorptionsspektren der R120H-Mutante (schwarz) und des Wildtyps (grau) von ChR-2 und ihre 2. Ableitungen (schwarz und grau gestrichelt). Der Absorptionsunterschied für  $\lambda < 450$  nm ist auf unterschiedliche Streueigenschaften der Proben zurückzuführen.

### 4.3.3 Ultrakurzzeitspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich

Um die Reaktionsdynamik der Retinalisomerisierung zu beobachten, wurde die R120H-Mutante von ChR-2 mit Hilfe der *pump-probe*-Methode im sichtbaren Spektralbereich untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Der Vergleich mit den in [68] publizierten Messungen des Wildtyps zeigt, dass das für R120H detektierte transiente Spektrum eine dem Wildtyp ähnliche spektrale Signatur sowie zeitliche Veränderung aufweist. Am kurzwelligen Ende des Spektrums ist im Bereich der Absorption des *all-trans*-Retinals ein negatives Signal des Grundzustandsbleichens zu sehen. Dieses Signal zerfällt innerhalb der ersten 10 ps und geht in ein konstantes negatives Signal über. Das positive Signal der Absorption des angeregten Zustands (ESA<sup>41</sup>) kann zwischen 500 nm und

<sup>41</sup> Excited State Absorption (eng.)

650 nm detektiert werden. Dieses zerfällt multiexponentiell und am Ende der Messzeit kann bei etwa 500 nm ein positives Signal der Absorption des Photoprodukts detektiert werden. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt die ESA-Bande eine deutliche Feinstruktur und es kann kein zweites K-ähnliches Intermediat beobachtet werden. [68,102]

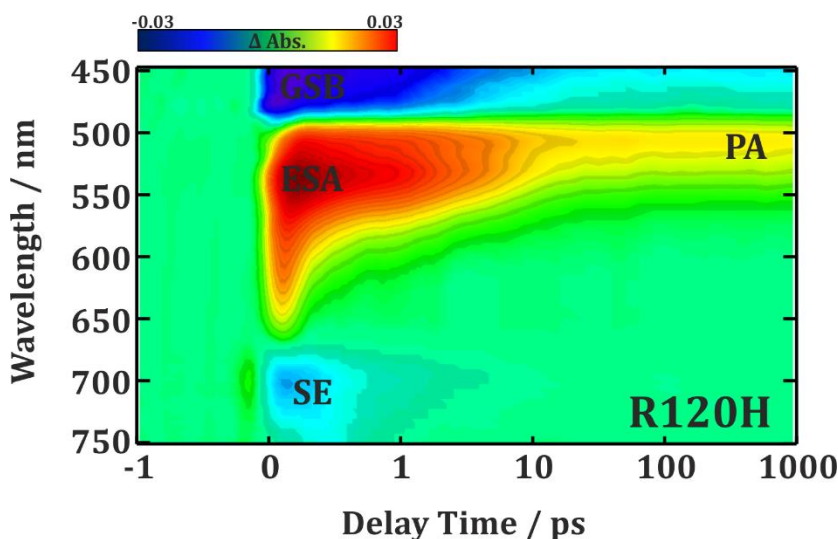


Abbildung 15: Transientes Absorptionsspektrum der R120H-Mutante von ChR-2 nach einer Anregung bei 480 nm. Falls nicht anders angegeben, wird bei allen in der Arbeit verwendeten transienten Absorptionsspektren folgende Farbcodierung verwendet: rot stellt positive, blau negative und grün keine Absorptionsänderung dar. Die Zeitachse ist bei allen Farbplots bis 1 ps linear und danach logarithmisch aufgetragen.

Zur genauen Untersuchung der Messergebnisse wurde die globale Fitanalyse der Daten unter Verwendung der Summe aus vier Exponentialfunktionen durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 16 zusammengefasst. Dabei zeigt Abbildung 16 A die Absorptionsspektren des Fits zu ausgewählten Verzögerungszeiten und Abbildung 16 B die Amplitudenspektren der ermittelten Zeitkonstanten  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  und  $\tau_4$ . Einzeltransienten zu ausgewählten Messwellenlängen, detektiert für die R120H-Mutante und den Wildtyp, sind in der Abbildung 16 C zu sehen. Der Wildtyp-Datensatz ist der Publikation [68] entnommen. Die globale Fitanalyse liefert vier Zeitkonstanten. Allerdings liegt die erste Zeitkomponente  $\tau_1 < 0,15$  ps innerhalb der Zeitauflösung und kann dementsprechend nicht ausreichend interpretiert werden. Die Zeitkonstante

$\tau_2 = 0,5$  ps hat einen positiven Beitrag im Bereich der Absorption des angeregten Zustandes und der stimulierten Emission, die ab 660 nm als kleine negative Bande zu sehen ist, und beschreibt den Zerfall des angeregten Zustandes. Außerdem hat diese Komponente eine negative Amplitude im Bereich der Grundzustandsabsorption. Die Zeitkonstante  $\tau_3 = 4,3$  ps beschreibt ebenso neben dem Zerfall des positiven Signals bei etwa 530 nm den Rückgang in den Grundzustand.

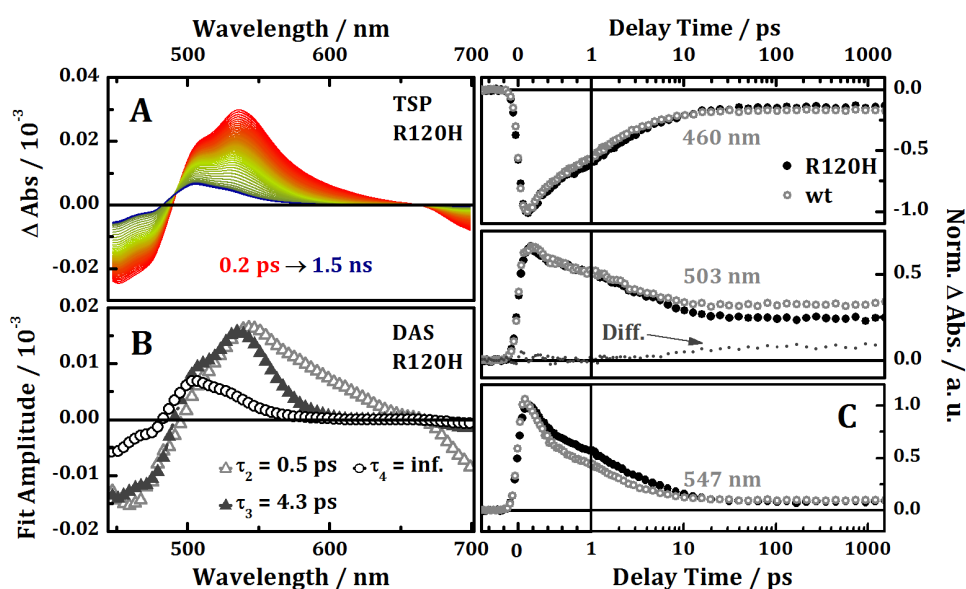


Abbildung 16: A) Transiente Absorptionsspektren (TSP<sup>42</sup>) von R120H nach der Fit-Analyse zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,2 ps und 1,5 ns. B) Zerfallsassozierte Spektren (DAS<sup>43</sup>) der Zeitkonstanten  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  und  $\tau_4$  von R120H. C) Einzeltransienten der R120H-Mutante (schwarz) und des Wildtyps (grau) von ChR-2 zu ausgewählten Abtastwellenlängen. Die Differenz zwischen den beiden Transienten bei 503 nm ist in der mittleren Abbildung als dunkelgraue gepunktete Linie dargestellt. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch aufgetragen.

Da diese Zeitkomponente keine Amplitude im Bereich der stimulierten Emission zeigt, kann diese, wie für den Wildtyp bereits vorgeschlagen,[68] einem Kühlprozess mit anschließender Bevölkung des all-*trans*- und 13-*cis*-Grundzustandes zugeordnet werden. Das  $\tau_4$ -Amplitudenspektrum stellt das Spektrum am Ende der Messzeit dar und zeigt eine negative Bande im Bereich

<sup>42</sup> Transient Spectra (eng.)

<sup>43</sup> Decay Associated Spectra (eng.)



der *all-trans*-Absorption sowie die Absorptionsbande des *13-cis*-Photoprodukts mit einem Maximum um 500 nm. Beim Vergleich der ermittelten Zeitkonstanten mit dem Wildtyp fällt auf, dass der Zerfall des angeregten Zustandes sowie die Produktbildung bei der R120H-Mutante etwas verlangsamt stattfinden. Dieser Effekt ist besonders gut in den Transienten bei 547 nm in der Abbildung 16 C zu sehen. Der Vergleich der Transienten im Bereich der Photoproduktabsorption zeigt außerdem, dass im Falle von R120H kein zweites  $P_1$ -Intermediat im beobachteten Zeitraum gebildet wird, was aus der Differenz der beiden Transienten bei 503 nm ersichtlich wird.

#### **4.3.4 Untersuchung des Photozyklus mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse**

Die Bildung weiterer Intermediate des Photozyklus der R120H-Mutante sowie des Wildtyps von ChR-2 wurde mittels Blitzlichtphotolyse untersucht. Obwohl der Wildtyp-Photozyklus bereits in [65,68,74] beschrieben und diskutiert wurde, wurden beide Proben unter Verwendung gleicher Messparameter direkt nacheinander gemessen, um eine direkte Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Anschließend wurden die Daten mit Hilfe der globalen Fit-Analyse ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 zusammengefasst. Die angepassten Datensätze für die R120H-Mutante und den Wildtyp sind dabei jeweils in Abbildung 17 A und B dargestellt. Abbildung 17 C zeigt die Amplitudenspektren der fünf ermittelten Zeitkonstanten. Die Transienten zu ausgewählten Wellenlängen im Bereich der Absorption der Intermediate sowie des Bleichsignals des *all-trans*-Retinals der beiden untersuchten Proben sind in Abbildung 17 D zu finden.

Der direkte Vergleich der beiden Messergebnisse zeigt, dass sich der Photozyklus der R120H-Mutante nicht wesentlich von dem des Wildtyps unterscheidet. Die spektrale Lage der Absorptionsbanden der detektierten Intermediate ist sehr ähnlich und man beobachtet für R120H lediglich einen leicht verlangsamteten Zerfall der Intermediate  $P_1$  und  $P_3$  sowie eine leichte

Verlangsamung der  $P_2$ -Bildung. Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass die Punktmutation an der Stelle 120 keine signifikante Veränderung des für ChR-2 üblichen Photozyklus bewirkt.

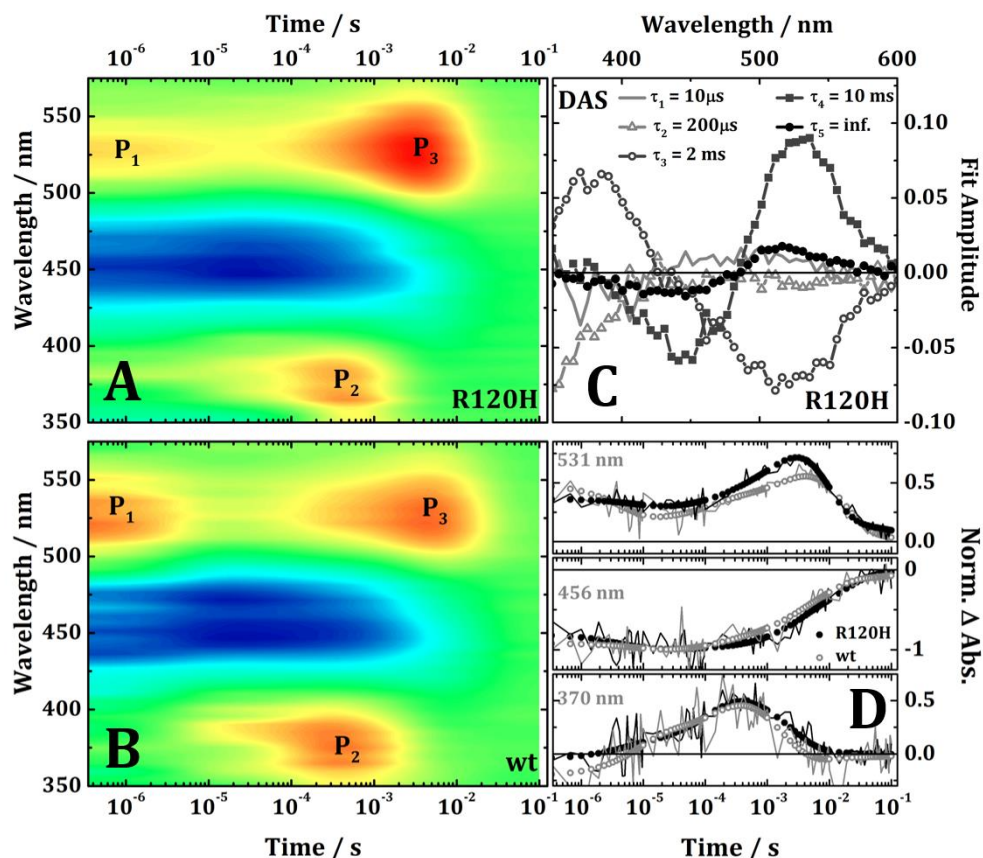


Abbildung 17: Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse-Experimente an der R120H-Mutante (A) und dem Wildtyp von ChR-2 (B). Rot stellt positive, blau negative und grün keine Absorptionsänderung dar. Die Zeitachse ist logarithmisch aufgetragen. C) Die Amplitudenspektren (hier: DAS) von R120H der durch die globale Fitanalyse gewonnenen Zeitkonstanten. D) Einzeltransienten der R120H-Mutante (schwarz) und des Wildtyps (grau) von ChR-2 zu ausgewählten Wellenlängen. Die Punkte stellen den dazugehörigen Fit dar. Die Zeitachsen sind logarithmisch dargestellt.

#### 4.3.5 Ultrakurzzeitspektroskopie im IR-Bereich

Die transiente Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich stellt zwar eine zuverlässige Methode dar, um die Intermediate des zu untersuchenden Photozyklus zu detektieren und ihre Lebensdauer zu bestimmen, sie liefert jedoch keine Informationen über die durch die Photoreaktion verursachten strukturellen Änderungen im Protein. Diese sind allerdings sehr wichtig in

Bezug auf die Frage, warum bei der R120H-Mutante trotz eines für ChR-2 üblichen Photozyklus keine Kanalfunktion beobachtet werden kann. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Ultrakurzzeitmessungen im infraroten Spektralbereich zwischen  $1500\text{ cm}^{-1}$  und  $1684\text{ cm}^{-1}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt. Anschließend wurden die Daten global angepasst und mit den in [69] publizierten Wildtyp-Messungen verglichen. Das Ergebnis des globalen Fits ist in Abbildung 18 als Farbplot dargestellt. Dabei wurden die Daten ab einer Verzögerungszeit von  $0,4\text{ ps}$  ausgewertet, da das Signal zur früheren Zeiten vom gestörten freien Induktionszerfall (PFID<sup>44</sup>)[58,103] und der Kreuzphasenmodulation[104] überlagert wird. Der Originaldatensatz der R120H-Mutante ist in Abbildung A 2 im Anhang dargestellt.

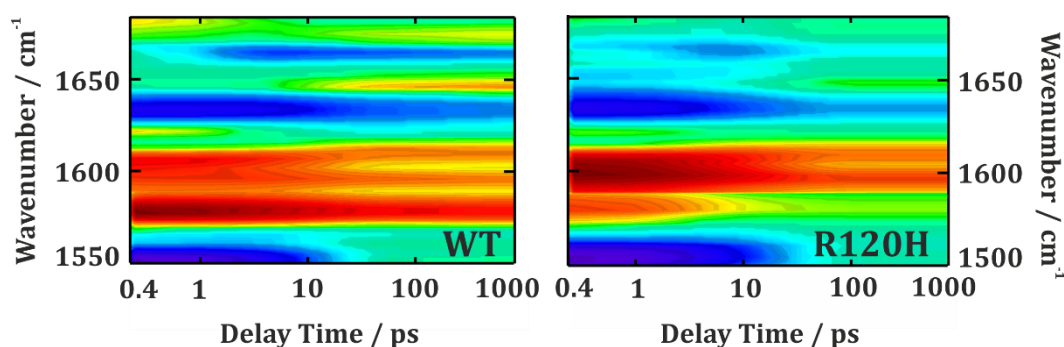


Abbildung 18: Ergebnis der globalen Fit-Analyse des Wildtyps (links) und der R120H-Mutante (rechts) im IR-Bereich ab einer Verzögerungszeit von  $0,4\text{ ps}$ .

Die Zuordnung der detektierten IR-Banden kann wie in [69] beschrieben erfolgen. Am hochfrequenten Rand des Spektrums ist um  $1665\text{ cm}^{-1}$  ein negatives Signal zu sehen, welches durch die C=O-Valenzschwingungen im Proteinerückgrat verursacht wird und der Amid I-Bande zugeordnet werden kann. Im Gegensatz dazu spiegeln die weiteren zwei negativen Banden bei  $1560\text{ cm}^{-1}$  und  $1635\text{ cm}^{-1}$  direkt die Retinalisomerisierung wider und werden jeweils der C=C-Streckschwingung sowie der C=N-Oszillation der Schiff-Base des all-*trans*-Retinals zugeordnet. Die C=C-Streckschwingung des 13-*cis*-Retinals ist dabei bei

<sup>44</sup> Perturbed Free Induction Decay (eng.)

1530  $\text{cm}^{-1}$  (nicht in Abbildung 18 abgebildet) zu finden. Die C=N-Streckschwingung der deuterierten Arginin-Seitenketten wird beim positiven Signal bei 1580  $\text{cm}^{-1}$  vermutet. Weitere Banden in dem dargestellten Bereich konnten bisher nicht eindeutig zugeordnet werden. Beim Vergleich der beiden Datensätze können zwei deutliche Unterschiede festgestellt werden: zum einen besitzt die Amid I-Bande von R120H eine wesentlich kleinere Amplitude und zeigt eine andere Dynamik als bei der Wildtyp-Probe. Außerdem sind deutliche Unterschiede beim positiven Signal bei 1580  $\text{cm}^{-1}$  festzustellen. Während die Schwingungsbande im Wildtyp nach einem von Kühlprozessen induzierten Abfall einen konstanten positiven Offset besitzt, ist das Signal bei der Mutantenmessung am Ende der Messzeit nicht mehr vorhanden. Die Einzeltransienten zu ausgewählten Wellenzahlen im Bereich der Retinalschwingungen sowie der Proteinsignale sind jeweils in Abbildung 19 A und B dargestellt. Abbildung 19 C zeigt Amplitudenspektren der drei durch die globale Anpassung ermittelten Zeitkonstanten. In Abbildung 19 D werden die Absorptionsspektren der R120H-Mutante und des Wildtyps am Ende der Messzeit (DAS von  $\tau_4 = \infty$ ) verglichen. Der Vergleich der Einzeltransienten in Abbildung 19 A zeigt lediglich einen leicht verlangsamten Zerfall der Retinalbanden im Falle von R120H, der sich auch in den durch die globale Fitanalyse gewonnenen Zeitkonstanten widerspiegelt. Die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , die für den Wildtyp 0,5 ps und 13 ps betragen, vergrößern sich unter der R/H-Mutation an der Stelle 120 zu 3 ps und 21 ps. Allerdings ist, wie bereits durch Kurzzeitmessungen im sichtbaren Spektralbereich gezeigt wurde, der Einfluss der Punktmutation auf die Retinalisomerisierung insgesamt sehr gering. Im Bereich der Proteinschwingungen dagegen erkennt man die oben angesprochenen Unterschiede. Die Amid I-Bande bei 1665  $\text{cm}^{-1}$ , die im Wildtyp auf einer sub-Picosekunden-Zeitskala gebildet wird und nach einem kurzen Abfall nach bereits 2 ps einen konstanten negativen Wert erreicht, ist bei der R120H-Mutante bereits am Anfang der Messung gebildet. Diese Bande besitzt eine positive Amplitude im  $\tau_1$ -Amplitudenspektrum und zerfällt anschließend mit

der

Zeitkonstante

$\tau_2 = 21$  ps. Das Endspektrum in Abbildung 19 D zeigt eine negative Bande bei  $1665\text{ cm}^{-1}$ , jedoch mit einer wesentlich kleineren Amplitude als im Wildtyp.

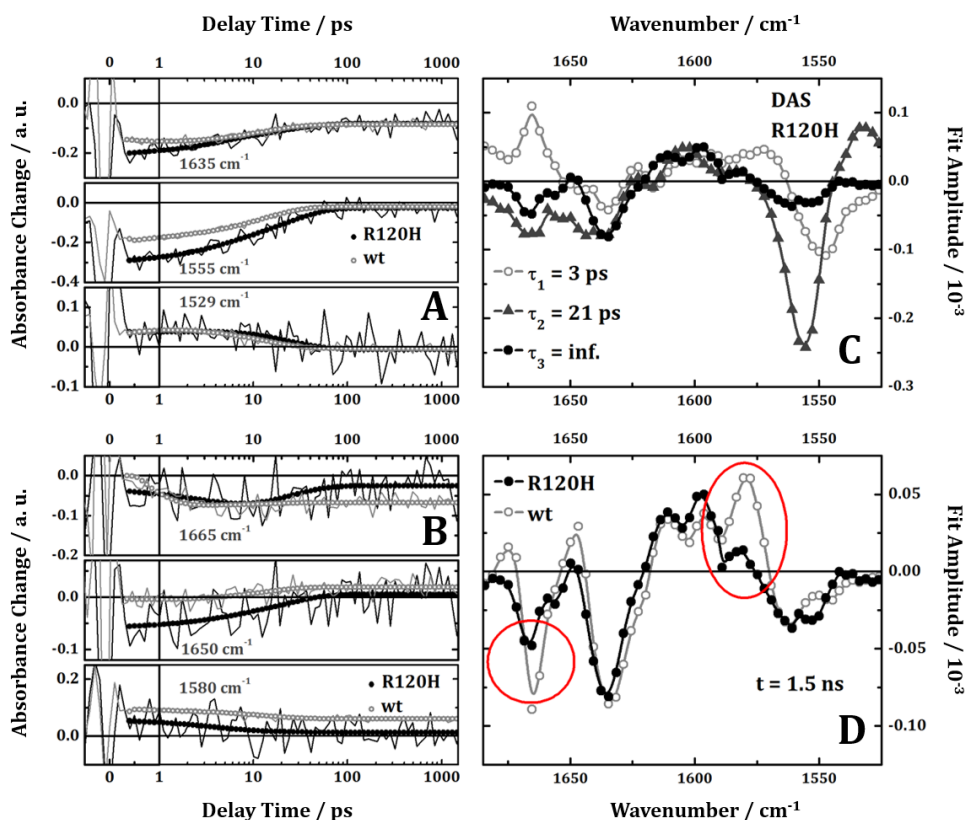


Abbildung 19: Einzeltransienten der R120H-Mutante (schwarz) und des Wildtyps (grau) von ChR-2 zu ausgewählten Wellenzahlen im Bereich der Retinalschwingungsbanden (A) und im Spektralbereich der Proteinmoden (B). Die dazugehörigen Fits sind als gepunktete Linien dargestellt. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch aufgetragen. C) Die Amplitudenspektren (hier: DAS) von R120H nach der globalen Fit-Analyse. D) Die Absorptionsspektren nach einer Verzögerungszeit von 1,5 ns (DAS von  $\tau_4$ ) des Wildtyps (grau) und der R120H-Mutante (schwarz) von ChR-2.

Im Gegensatz dazu ist die Bande bei  $1580\text{ cm}^{-1}$ , die beim Wildtyp im Unendlich-Spektrum die größte positive Amplitude besitzt, bei der R120H-Mutante am Ende der Messzeit nicht mehr zu sehen.

### 4.3.6 Diskussion

Um der Frage nachzugehen, warum die R120H-Mutante von ChR-2 im Gegensatz zum Wildtyp keine Kanalaktivität zeigt, wurden Untersuchungen der Primärreaktion im sichtbaren und im IR-Spektralbereich sowie des nachfolgenden Photozyklus mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die Isomerisierung des Retinals von *all-trans* zu *13-cis* auch nach der Mutation stattfindet, verglichen mit dem Wildtyp allerdings etwas verlangsamt. Die Absorption des angeregten Zustandes zerfällt biexponentiell und es kann lediglich ein Photoprodukt nach 1,8 ns detektiert werden. Die Verlangsamung des Zerfalls des angeregten Zustandes konnte bisher durch Punktmutationen innerhalb des Gegenionenkomplexes sowie durch Veränderungen des pH-Wertes hervorgerufen werden. Abbildung 20 zeigt Einzeltransienten des Wildtyps bei zwei verschiedenen pH-Werten sowie der Mutanten D253N, E123T und R120H bei 526 nm im Vergleich. Der Wildtyp-Datensatz bei pH = 7,4 ist der Publikation [68] und die Messungen des Wildtyps bei pH = 4 und der Mutante E123T der Publikation [102] entnommen. Die Absorptionsänderungen der D253N-Mutante wurden von Dr. Frank Scholz (AG Wachtveitl, Goethe Universität, Frankfurt am Main) gemessen. Wie aus Abbildung 20 ersichtlich wird, zeigt die Transiente im Bereich des ESA-Signals der R120H-Mutante einen dem Wildtyp bei einem pH-Wert von 4 ähnlichen Verlauf. Auch bei den Mutanten D253N und E123T ist eine deutliche Verlangsamung des ESA-Zerfalls zu sehen. Die Bildung des zweiten P<sub>1</sub>-Intermediats kann bei allen Proben mit Ausnahme des Wildtyps bei pH = 7,4 nicht festgestellt werden. Diese Beobachtungen wie die Tatsache, dass die Mutante D253N ebenfalls keine Kanalaktivität zeigt,[65] lassen eine durch die Punktmutation an der Stelle 120 verursachte Veränderung der pK<sub>s</sub>-Werte innerhalb der Bindetasche vermuten. Im Falle von Bacteriorhodopsin führt der Austausch von Arginin in der Position 82 durch Glutamin zu einer Erhöhung des pK<sub>s</sub>-Wertes des primären Protonenakzeptors D85.[105] Allerdings gehört der Aminosäurerest R82 in BR zu einem Wasserstoffbrückennetzwerk, verknüpft mit D85 und D212 über drei Wassermoleküle,[106] was für Arg-120 im ChR-2

nicht zutrifft.[78,89] Die spektroskopische Untersuchung des nachfolgenden Photozyklus der R120H-Mutante im sichtbaren Spektralbereich mit Hilfe des Blitzlichtphotolyse-Aufbaus zeigt keine wesentlichen Unterschiede zu dem Photozyklus des Wildtyps, was auf ähnlich ablaufende Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen innerhalb der Retinal-Bindetasche hindeutet. Um dies zu prüfen, sind jedoch zeitaufgelöste IR-Messungen im Bereich der Carbonylschwingungen erforderlich.

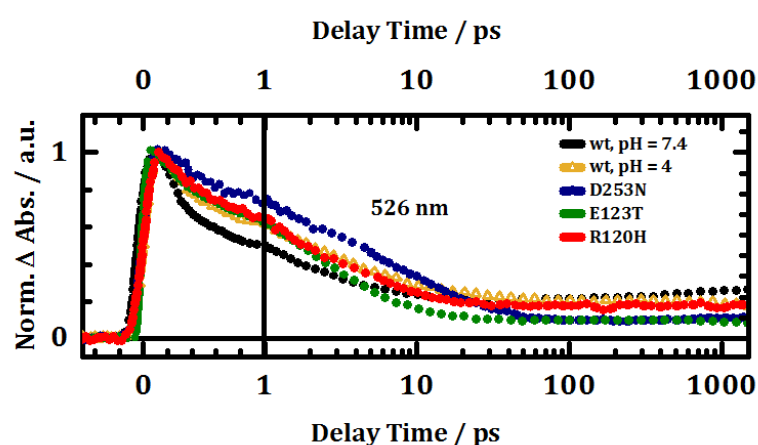


Abbildung 20: Transiente Absorptionsänderung bei 526 nm des Wildtyps bei pH-Werten von 7,4 (schwarz)[68] und 4 (gelb)[102] sowie der Mutanten D253N (blau), E123T (grün)[102] und R120H. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch aufgetragen.

Aufgrund der Tatsache, dass nach den durchgeführten spektroskopischen Untersuchungen der R120H-Mutante von ChR-2 im sichtbaren Spektralbereich keine signifikante Auswirkung der Punktmutation auf die Retinalisomerisierung und den Photozyklus bei fehlender Kanalaktivität festgestellt werden konnte, wurden anschließend Kurzzeit-IR-Messungen zwischen  $1500\text{ cm}^{-1}$  und  $1684\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung deutet auf einige durch die Punktmutation verursachte strukturelle Änderungen im Protein hin. Dies wird insbesondere beim Vergleich der Amid I-Schwingung der R120H-Mutante und des Wildtyps deutlich. Beim Wildtyp zeigt die Amid I-Bande bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  auf einer ultrakurzen Zeitskala einen für Retinalproteine außergewöhnlichen Verlauf. Die Bildung des negativen Signals erfolgt sehr

schnell (0,5 ps), ist vorwiegend unbeeinflusst von Kühlprozessen und deutet somit auf eine sehr schnelle Antwort des Proteingerüsts auf die Retinalisomerisierung sowie eine effektive Weitergabe der Überschussenergie an das Protein hin.[69] Bei der R120H-Mutante dagegen zeigt die Amid I-Bande einen ganz anderen Verlauf. Nach einer im Vergleich zum Wildtyp verlangsamten Bildung mit  $\tau_1 = 3$  ps erfolgt eine hauptsächlich durch Kühlprozesse verursachte Abnahme des Signals mit  $\tau_2 = 21$  ps. Auch die Amplitude der Bande am Ende der Messzeit, die im Wildtyp für Retinalproteine außergewöhnlich groß ist und sich im Bereich der Retinalschwingungen befindet, ist bei der Mutante wesentlich kleiner. Die Punktmutation an der Stelle 120 hat also einen Einfluss auf die strukturellen Änderungen im Proteinrückgrat während der Retinalisomerisierung.

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen einer ultraschnellen Proteinantwort auf die Retinalanregung und der Kanalaktivität des Proteins besteht, wurden zwei weitere Mutanten, E123T und D253N, im Bereich der Amid I-Schwingung spektroskopisch untersucht. Die E123T-Mutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine doppelt so schnelle Kanalöffnung und einen 5-mal so schnellen Zerfall des  $P_4$ -Intermediats.[96,107] Der Austausch des primären Protonenakzeptors D253 durch einen Asparagin-Rest führt hingegen zu einem Verlust der Kanalaktivität.[65] Die Proben der drei zu untersuchenden Mutanten wurden mit einem Laserpuls der Wellenlänge von 480 nm angeregt und im Spektralbereich zwischen  $1590\text{ cm}^{-1}$  und  $1684\text{ cm}^{-1}$  abgetastet. Anschließend wurden die Daten ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps mit Hilfe einer globalen Anpassung (Summe aus drei Exponentialfunktionen) ausgewertet. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Darstellung der gemessenen Daten der drei Mutanten ist zusätzlich in Abbildung A 2 und Abbildung A 3 im Anhang zu finden. Der Wildtyp-Datensatz ist der Publikation [69] entnommen. Bei der E123T-Mutante ist die negative Amid I-Bande bei  $1658\text{ cm}^{-1}$  zu sehen und ist somit verglichen mit dem Wildtyp um  $7\text{ cm}^{-1}$  verschoben. Diese Verschiebung deutet möglicherweise auf eine geringe durch die Mutation verursachte strukturelle Änderung im



Proteinrückgrat hin. Allerdings ist die Bildung der Bande sehr schnell und die Amplitude des Signals nach 1,8 ns ist ähnlich groß wie die des Wildtyps.

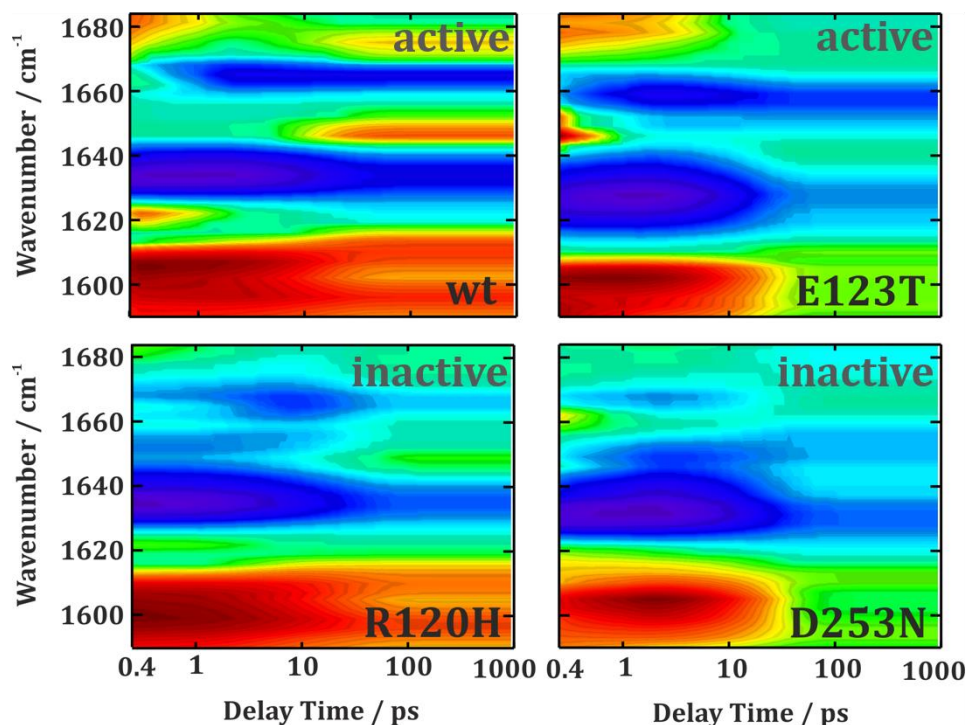


Abbildung 21: Transiente Absorptionsspektren des Wildtyps (oben links)[69] sowie der Mutanten E123T (oben rechts), R120H (unten links) und D253N (unten rechts) von ChR-2 nach der globalen Fit-Analyse ab einer Verzögerungszeit von 0,4 ps.

Zur besseren Veranschaulichung sind in Abbildung 22 Einzeltransienten zu ausgewählten Wellenzahlen sowie Absorptionsspektren der vier untersuchten Proben nach der globalen Fit-Analyse zu ausgewählten Verzögerungszeiten dargestellt. Im Vergleich zu den Proben mit einer intakten Kanalfunktion zeigt das transiente Absorptionsspektrum der D253N-Mutante einen durch Kühlprozesse verursachten Zerfall des negativen Signals um 1665  $\text{cm}^{-1}$ . Zusätzlich bildet sich innerhalb der ersten 10 ps eine sehr kleine negative Bande bei 1660  $\text{cm}^{-1}$ , die sich bei längeren Verzögerungszeiten zu 1653  $\text{cm}^{-1}$  spektral verschiebt. Somit kann bei der D253N-Mutante keine definierte Amid I-Bande, die eine Proteinantwort auf die Retinalisomerisierung widerspiegelt, detektiert werden. Wie bereits beschrieben, ist die Amplitude des Amid I-Signals der

R120H-Mutante wesentlich kleiner als im Wildtyp. Außerdem zeigt das Spektrum nach 1,8 ns eine zusätzliche Schulter bei 1657  $\text{cm}^{-1}$ , deren spektrale Lage der Amid I-Schwingung der E123T-Mutante entspricht.

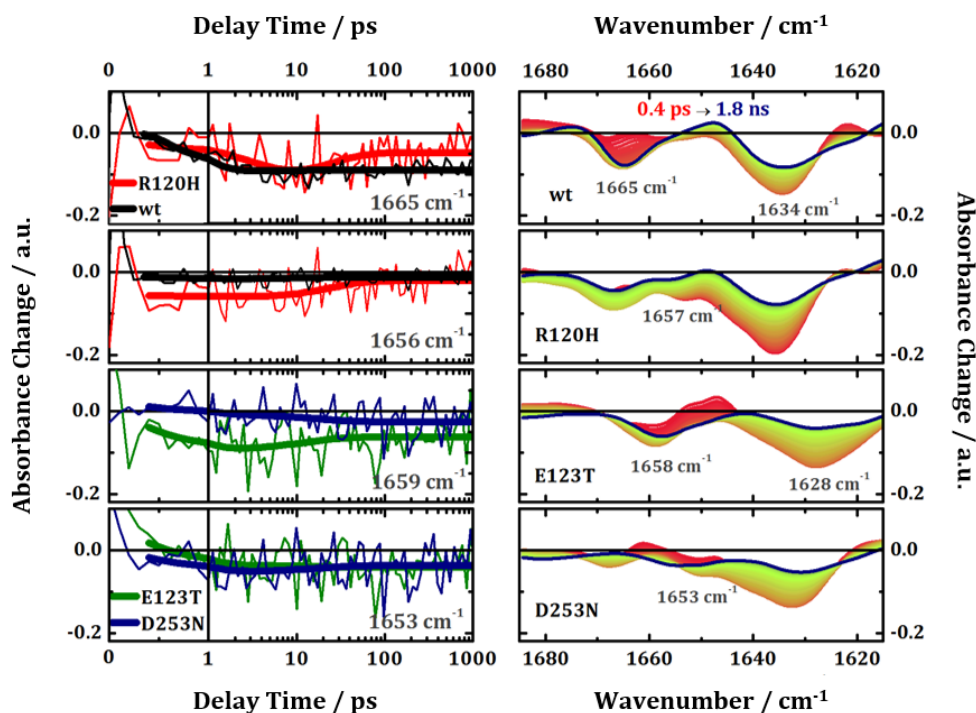


Abbildung 22: Einzeltransienten im Bereich der Amid I-Schwingungsbande (links) sowie die transiente Absorptionsspektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,4 ps und 1,8 ns des Wildtyps[69] und der Mutanten R120H, E123T und D253N von ChR-2 (rechts).

Diese zusätzliche Bande mit einer relativ kleinen Amplitude könnte ebenfalls auf durch die Punktmutation verursachte strukturelle Änderungen im Protein hindeuten. Doch während bei der E123T-Mutation die Kanalfunktion intakt ist, führen bei der R120H-Mutante die Änderungen im Protein zu einer geringeren Retinal-Protein-Interaktion, verknüpft mit einem weniger effektiven Transfer der Überschussenergie an das Proteinerückgrat während der Primärreaktion. Diese Veränderungen spiegeln sich in einem reduzierten oder wie im Falle der D253N-Mutante nicht zu detektierenden Amid I-Signal wider und sind möglicherweise für die reduzierte Kanalaktivität des Retinalproteins verantwortlich.

Neben den Veränderungen im Amid I-Bereich konnten bei ChR-2 nach der R/H-Mutation an der Stelle 120 auch Unterschiede im Bereich der Differenzbande bei  $1580\text{ cm}^{-1}$  festgestellt werden. Während beim Wildtyp diese Bande im untersuchten Spektralbereich am Ende der Messzeit die größte Amplitude aufweist, konnte bei der R120H-Mutante keine Absorptionsänderung bei  $1580\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden. Um zu überprüfen, ob dieses Signal im Wildtyp dem Arginin-Rest zugeordnet werden kann, wurden von Dr. Tom Resler (AG Heberle, FU Berlin) IR-Spektren von Guanidinhydrochlorid in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  (GuaHCl und GuaDCl) als Modellsystem für Arginin-Seitenketten aufgenommen.[108] Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.

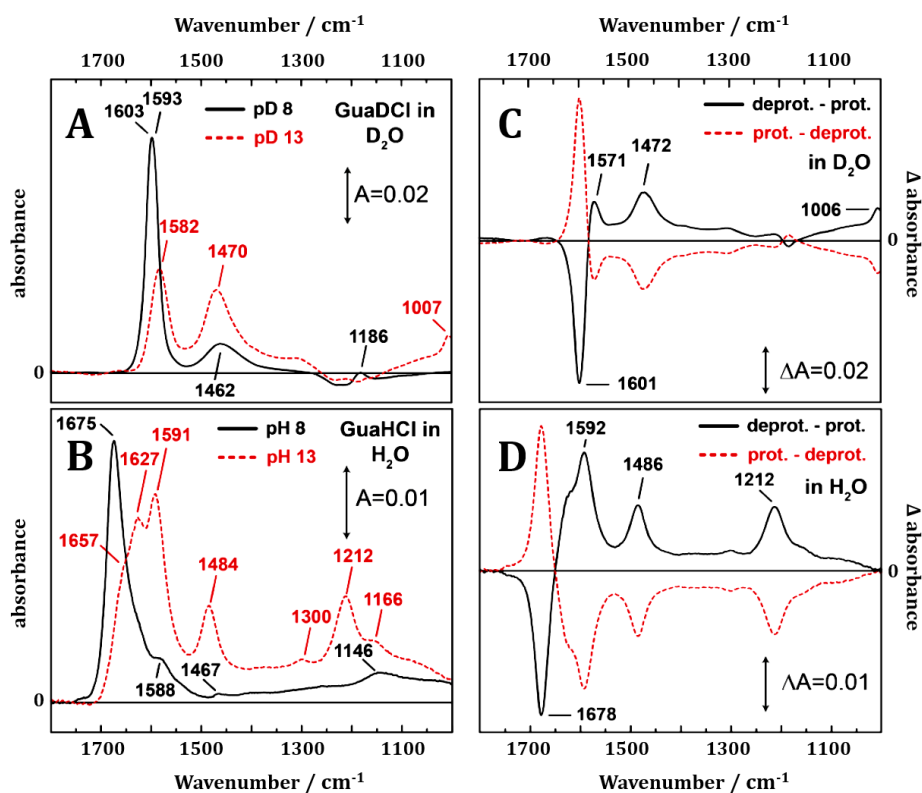


Abbildung 23: IR-Spektren von Guanidinhydrochlorid in  $\text{D}_2\text{O}$  (A) und  $\text{H}_2\text{O}$  (B) bei pH-Werten 8 (schwarz) und 13 (rot) sowie die daraus resultierenden Differenzspektren (C-D).[108]

In  $\text{D}_2\text{O}$  bei einem pD-Wert von 8, bei dem GuaDCl protoniert vorliegt, konnte eine positive Schwingungsbande bei  $1593\text{ cm}^{-1}$  mit einer Schulter bei  $1603\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden, die der Streckschwingung der  $\text{CN}_3$ -Gruppe gekoppelt mit der

ND<sub>2</sub>-Scherenmode zugeordnet werden konnte.[109] Unter Deprotonierung (pD = 13) verschiebt sich diese Bande zu 1582 cm<sup>-1</sup> und verliert deutlich an Intensität (siehe Abbildung 23 A). Die Differenzspektren zwischen deprotonierter und protonierter Form zeigen somit zwei *Peaks* bei 1601 cm<sup>-1</sup> und 1571 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 23 C). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Differenzbanden des GuaDCI und der Arginin-Reste im Protein durch ihre Umgebung beeinflusst werden und somit leichte Unterschiede zeigen können, kann aufgrund der Modellsystem-Messung die Absorptionsänderung bei 1580 cm<sup>-1</sup> den Arginin-Seitenketten zugeordnet werden. Darüber hinaus kann in dem hier diskutierten Zeitbereich von 1,8 ns nicht von Deprotonierungsreaktionen ausgegangen werden.

Wie die Kristallstruktur von ChR-2 zeigt, ist R120 ein Teil eines großen Wasserstoffbrückennetzwerks, das indirekt über mehrere Wassermoleküle mit dem Gegenionenkomplex verbunden ist.[89] Nach Volkov et al. führt die Isomerisierung des Retinals zu einer Störung des Netzwerks, was die Öffnung der drei „*gates*“ und somit des Kanals vorbereitet. Da sich R120 im Zentrum des „*extracellular gate*“ befindet, wird diesem Aminosäurerest eine der zentralen Rollen bei diesem Vorgang zugeschrieben. Die Tatsache, dass bei den Kurzzeitmessungen im IR-Bereich die Wildtyp-Probe Änderungen der Arginin-Schwingungsfrequenz sowie eine ungewöhnlich intensive Amid I-Bande zeigt, unterstützt diese Theorie. Nach Anregung und anschließender Isomerisierung des Chromophors kommt es zu einer schnellen und effektiven Übergabe der Überschussenergie an das Protein. Diese führt zu Verschiebungen innerhalb des Wasserstoffbrückennetzwerks, die sich in einer intensiven Amid I-Bande widerspiegeln. Die darauffolgenden strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins bewirken das Öffnen der „*gates*“, die die mit Wasser gefüllten Hohlräume voneinander trennen, und ermöglichen somit den Kationenfluss.[89] Die Wegnahme eines für die Kanalöffnung wichtigen Aminosäurerestes wie R120 oder D253 führt zu einer Stilllegung der Kanalfunktion. Während D253 gleichzeitig als Protonenakzeptor am Protonenpumpemechanismus beteiligt ist,[65] nimmt R120 aufgrund seiner Lage

nicht am Photozyklus teil. Aus diesem Grund hat die Punktmutation an dieser Stelle ausschließlich Einfluss auf die Kanalfunktion bei einem für ChR-2 gewöhnlichen Photozyklus. Diese Feststellung bestätigt die Vermutung, dass beide Prozesse zwar durch die Isomerisierung des Retinals initiiert werden, jedoch unabhängig voneinander ablaufen.

#### **4.4 Spektroskopische Untersuchungen an ChR-2 mit einem „geblockten“ Retinal**

Wie in 4.2 und 4.3 diskutiert wurde, spielt ein effizienter Übertrag der Überschussenergie vom lichtangeregten Chromophor zum Protein eine entscheidende Rolle für die Kanalfunktion des Retinalproteins ChR-2. Dabei sind eine starke Retinalkopplung in der Bindetasche sowie eine schnelle Isomerisierungsreaktion sehr wichtig. Eine erprobte Methode, den Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Proteinfunktion zu untersuchen, stellt der Einsatz modifizierter Retinalchromophore dar.[110,111] So sollen im Folgenden Ergebnisse spektroskopischer Studien an ChR-2 mit einem mit Phenyl-Ring modifizierten Retinal, hier dem 9,12-Phenylretinal (PheRet), vorgestellt werden. Dieses Retinal-Analogon, synthetisiert in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Gärtner (MPI für Chemische Energiekonversion, Mülheim an der Ruhr), wurde bereits in Bacteriorhodopsin eingesetzt.[90] Während in Isopropanol das all-*trans*-Isomer nach Photoanregung zu 7-*cis*- und 13-*cis*-Verbindungen im Verhältnis 20:13:67 reagierte, konnte in BR keine Photoreaktion beobachtet werden. Umso überraschender war das Ergebnis elektrophysiologischer Studien an mit PheRet rekonstituiertem ChR-2, durchgeführt von Dr. Christian Bamann (AG Bamberg, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main), die keine signifikante Verminderung der Photoströme im Vergleich zum nicht modifizierten Protein zeigen (Abbildung 24 B). Obwohl in Bacteriorhodopsin die Retinalisomerisierung, die eine Rotation um die 12,13-Einfachbindung erfordert, gehemmt zu sein scheint,[90] zeigt ChR-2 mit „geblocktem“ Chromophor eine intakte Kanalfunktion.

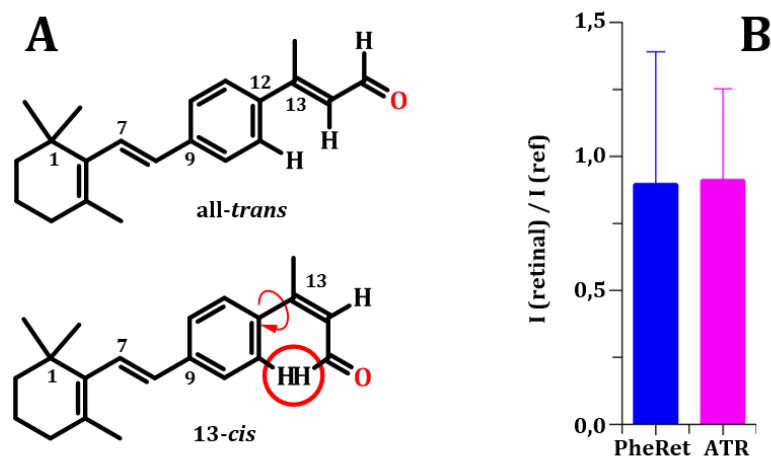


Abbildung 24: (A) Strukturformeln des all-trans- und 13-cis-Isomers des 9,12-Phenylretinals. Der rote Pfeil deutet auf eine für die Isomerisierung notwendige Rotation um die 12-13-Einfachbindung und der Kreis auf eine mögliche sterische Hinderung zwischen den beiden H-Atomen hin.[90] (B) Das Amplitudenverhältnis der Photoströme von ChR-2 vor und nach der Rekonstitution mit PheRet (blau) und ATR (magenta). Die Messungen wurden von Dr. Christian Bamann (AG Bamberg, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main) durchgeführt.

Die dargestellten Ergebnisse sind ein Teil der folgenden Publikation, die sich aktuell in Vorbereitung befindet:

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

#### 4.4.1 Probenpräparation und Experimentelles

Die solubilisierten Proben (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1 % DM, pH = 7,4) wurden von Dr. Christian Bamann (AG Bamberg, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main) bereitgestellt. Das **UV-pump-UV/vis-probe**-Experiment an ChR-2 mit einem modifizierten Chromophor wurde unter Verwendung des Clark MXR-CPA-2001 Lasersystems (Horiba Jobin Yvon GmbH, Bensheim) durchgeführt. Der vollständige Aufbau ist in 3.1.3 beschrieben. Der Anregungspuls mit einer Wellenlänge von 387 nm wurde über die Frequenzverdopplung (SHG) der

Laserfundamentalen generiert und auf Pulsenergien von  $\sim 80$  nJ eingestellt. Für die Abtastung wurde das in einem  $\text{CaF}_2$ -Kristall ( $d = 5$  mm) generierte Weißlicht verwendet. Der Polarisationswinkel zwischen den beiden Pulsen wurde auf  $54,7^\circ$  („magischer Winkel“) eingestellt. Die Zeitauflösung des Experiments betrug

$\sim 220$  fs mit einer spektralen Auflösung von 4 nm. Die anschließende Datenanalyse erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms z20.

Die **Blitzlichtphotolyse**-Messungen erfolgten in einer ( $2 \times 10$ ) mm Quarzküvette nach einer Anregung der Proben bei 408 nm ( $\sim 2,5$  mJ/cm<sup>2</sup>). Das Abtastlicht wurde durch eine Xe-Blitzlampe (L7685, Hamamatsu) generiert und anschließend mit Hilfe einer ICCD-Kamera (PI-MAX 3, Princeton Instruments) mit einer Integrationszeit von 333 ns detektiert. Der vollständige Aufbau ist in 3.2 beschrieben. Die Datenauswertung erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms OPTIMUS.[59]

#### 4.4.2 Stationäre Charakterisierung

Abbildung 25 zeigt das stationäre Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des „geblockten“ 9-12-Phenylretinals (PheRet), rekonstituiert in ChR-2. Während das Absorptionsspektrum des ATR eine Schwingungsfeinstruktur mit Maxima bei 413 nm, 448 nm und 472 nm aufweist (siehe Abbildung 14),[67,75] zeigt das Spektrum von PheRet eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 398 nm. Die spektrale Verbreiterung im Falle des durch einen Phenyl-Ring modifizierten Retinals deutet auf den Verlust einer starren Retinalkopplung innerhalb der Bindetasche im Vergleich zu ATR hin, die durch sterische Beanspruchung des modifizierten Analogons verursacht wird. Allerdings ist der Opsin-Shift für beide Retinale sehr ähnlich, was für ähnliche Wechselwirkungen der Chromophore mit ihrer Umgebung spricht.[112,113] Die Energiedifferenz der Absorptionsmaxima von PheRet in ChR-2 und Isopropanol beträgt  $\sim 5100$  cm<sup>-1</sup> ( $\sim 1200$  cm<sup>-1</sup> im Vergleich zum Retinal mit protonierter Schiff-Base in Lösung). Für das nicht modifizierte all-*trans*-Retinal beträgt diese Differenz

$\sim 5000 \text{ cm}^{-1}$  ( $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  verglichen mit dem Retinal mit protonierter Schiff-Base in Isopropanol).[90]

Das Fluoreszenzspektrum des 9-12-Phenylretinals zeigt ein breites Signal mit einem Maximum bei 480 nm. Somit beträgt die Stokes-Verschiebung  $\sim 4300 \text{ cm}^{-1}$ .

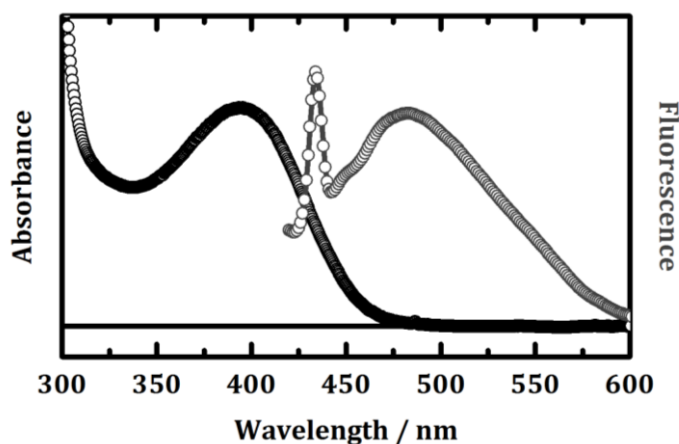


Abbildung 25: Stationäres Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von 9,12-Phenylretinal in ChR-2. Im Fluoreszenzspektrum ist bei 434 nm zusätzlich ein Raman-Peak zu sehen.

#### 4.4.3 Ergebnisse der *pump/probe*-Experimente im UV/vis-Bereich

Um der Frage nachzugehen, ob das 9-12-Phenylretinal in ChR-2 nach der Anregung mit UV-Licht isomerisiert, wurden transiente Absorptionsmessungen mit Hilfe des UV-*pump*-UV/*vis-probe*-Aufbaus durchgeführt. Die Probe wurde dabei mit Laserpulsen der Wellenlänge von 387 nm angeregt und zwischen 350 nm und 700 nm abgetastet. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt. Wie aus dem Farbplot ersichtlich ist, zeigt das transiente Spektrum zwei positive Differenzbanden bei 470 nm und 630 nm. Diese Signale, die der Absorption des angeregten Zustands (ESA) zugeordnet werden können, bilden sich direkt nach der Anregung und zerfallen auf unterschiedlichen Zeitskalen. Die negative Bande am „kurzwelligeren“ Ende des Spektrums kann aufgrund ihrer spektralen Lage im Bereich der Absorption des PheRet vor der Anregung dem Grundzustandsbleichen (GSB) der Probe zugeordnet werden. Dieses Signal



zerfällt multiexponentiell und zeigt eine konstante, negative Amplitude am Ende der Messzeit. Außerdem ist bei ca. 450 nm die Absorptionsänderung des Photoprodukts zu sehen.

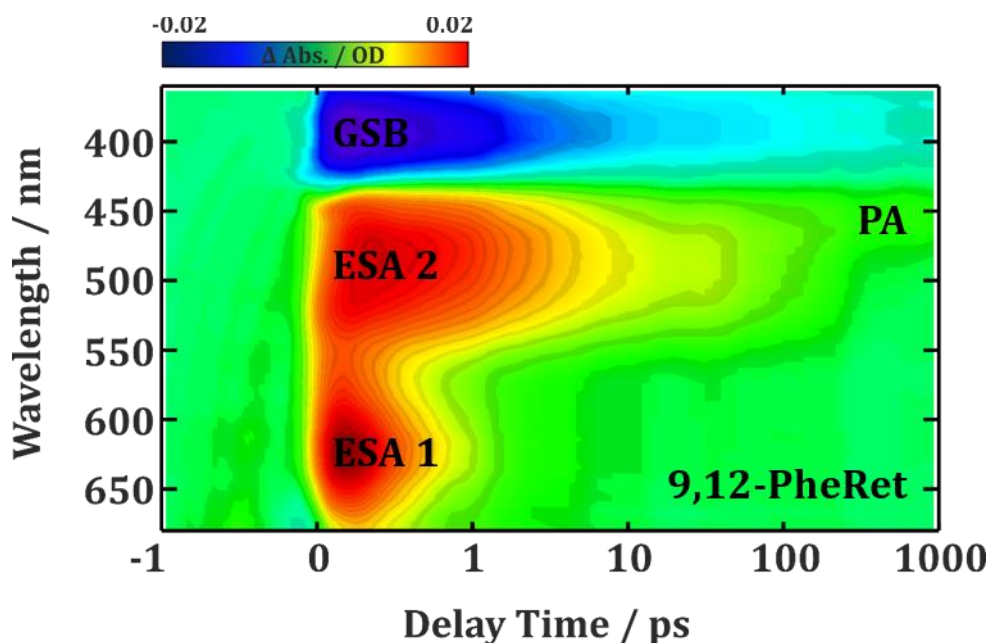


Abbildung 26: Transientes Absorptionsspektrum von mit 9,12-Phenylretinal rekonstituiertem ChR-2 nach einer Anregung bei 387 nm. Das Spektrum zeigt zwei positive Signale der Absorption des angeregten Zustands (ESA<sup>45</sup> 1 und 2), das negative Bleichsignal der Grundzustandpopulation (GSB<sup>46</sup>) sowie die positive Bande der Photoproduktabsorption (PA<sup>47</sup>).

Um das Ergebnis besser analysieren und interpretieren zu können, wurde der Datensatz mit Hilfe eines globalen exponentiellen Fits angepasst. Dabei konnten fünf Zeitkonstanten bestimmt werden. Abbildung 27 zeigt die Fit-Amplituden der Zeitkomponenten (A), Absorptionsänderungen zu ausgewählten Verzögerungszeiten (B) sowie Einzeltransienten im Bereich der GSB- und ESA-Signale sowie der Produktabsorption (C).

<sup>45</sup> Excited State Absorption (eng.)

<sup>46</sup> Ground State Bleaching (eng.)

<sup>47</sup> Product Absorption (eng.)

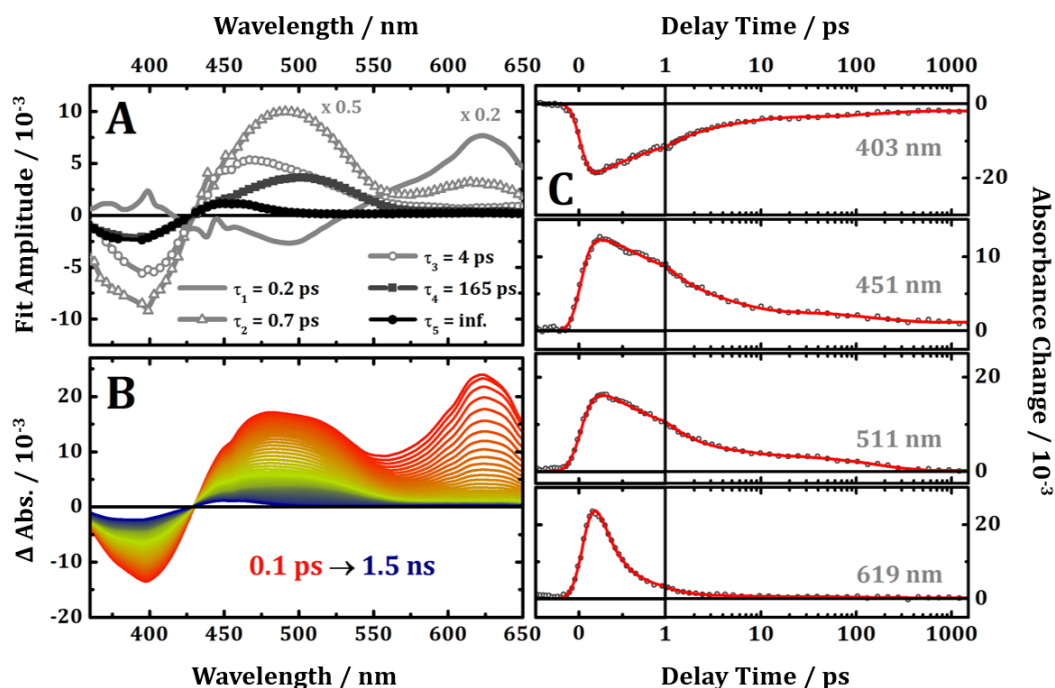


Abbildung 27: (A) Zerfallsassozierte Spektren der durch die globale Fitanalyse erhaltenen Zeitkonstanten von ChR-2 mit PheRet. Für eine übersichtliche Darstellung wurden die Amplitudenspektren der Zeitkomponenten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  jeweils mit den Faktoren 0,2 und 0,5 multipliziert. (B) Zeitschnitte (Fits) von PheRet in ChR-2 zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,1 ps und 1,5 ns. (C) Einzeltransienten zu ausgewählten Wellenlängen von PheRet in ChR-2. Die durchgezogenen Linien (rot) stellen jeweils die Fit-Kurven dar. Die Zeitachsen sind bis 1 ps linear und danach logarithmisch dargestellt.

Das ESA 1-Signal bei 630 nm zerfällt biexponentiell mit zwei Zeitkonstanten im sub-Pikosekundenbereich  $\tau_1 = 200$  fs und  $\tau_2 = 700$  fs. Dabei wird die schnellere  $\tau_1$ -Komponente mit einer mehr als doppelt so großen Amplitude deutlich bevorzugt. Das Amplitudenspektrum von  $\tau_1$  zeigt außerdem eine negative Amplitude bei 490 nm und beschreibt die Bildung des positiven Signals in diesem Spektralbereich und somit die Population des ESA 2-Signals mit dieser Zeitkonstante. Die ESA 2-Bande zerfällt hauptsächlich mit  $\tau_2 = 700$  fs und zwei zusätzlichen Zeitkonstanten  $\tau_3 = 4$  ps und  $\tau_4 = 165$  ps. Während das Amplitudenspektrum der  $\tau_3$ -Zeitkonstante ein Maximum bei 468 nm aufweist, ist das Maximum des  $\tau_4$ -Spektrums um 35 nm rotverschoben. Diese spektrale Verschiebung kann durch bei 450 nm detektierte und im  $\tau_5$ -Spektrum sichtbare Photoproduktbildung erklärt werden.

Insgesamt deutet der multiexponentielle Zerfall des angeregten Zustands auf eine komplexe Beschaffenheit der  $S_1$ -Potentialfläche und auf einen vom all-*trans*-Retinal verschiedenen Verlauf der Primärreaktion hin. Es ist jedoch festzuhalten, dass am Ende der Messzeit ein Photoprodukt detektiert werden kann.

#### 4.4.4 Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse-Experimente

In ChR-2 werden Bildung und Abbau späterer Intermediate des Photozyklus mit der Öffnung bzw. -schließung des Kanals in Verbindung gebracht. So wird z.B. der  $P_3$ -Zustand mit einem offenen Kanal assoziiert.[67,70] Um sicher zu stellen, ob im Falle von PheRet weitere Intermediate gebildet werden, wurden spätere Schritte des möglichen Photozyklus mit Hilfe des Blitzlichtphotolyse-Experiments zwischen 300 nm und 500 nm in einem Zeitbereich von 333 ns bis 300 ms untersucht. Der Datensatz wurde anschließend mit Hilfe der globalen Fitanalyse ausgewertet und ist in Abbildung 28 dargestellt. Dabei sind in Abbildung 28 A und B Absorptionsänderungen (Fit) von PheRet und Wildtyp (erstmalig in 4.3.4 vorgestellt) nach der Anregung als Farbplots zu sehen. Abbildung 28 C zeigt die Amplitudenspektren der für PheRet ermittelten Zeitkonstanten. Die Einzeltransienten zu ausgewählten Zeiten von PheRet und ATR in ChR-2 sind in Abbildung 28 D dargestellt. Im Gegensatz zum  $P_1$ -Intermediat des all-*trans*-Retinals ist das erste Photoprodukt nach der Anregung des modifizierten 9,12-Phenylretinals, welches im *pump-probe*-Experiment bei 450 nm detektiert wurde, zu Beginn der Blitzlichtphotolyse-Messung bereits abgebaut. Stattdessen kann mit der Zeitkonstante  $\tau_1 = 500$  ns die Bildung eines zusätzlichen Intermediats  $P_x$  im Spektralbereich des Bleichsignals beobachtet werden. Der Aufbau des blauverschobenen  $P_2$  erfolgt in zwei Schritten. Das erste Intermediat, hier  $P'_2$  genannt, bildet sich gleichzeitig mit dem Abbau von  $P_x$  mit der Zeitkonstante  $\tau_2 = 8$   $\mu$ s. Die  $P''_2$ -Bildung erfolgt verspätet mit  $\tau_3 = 190$   $\mu$ s.

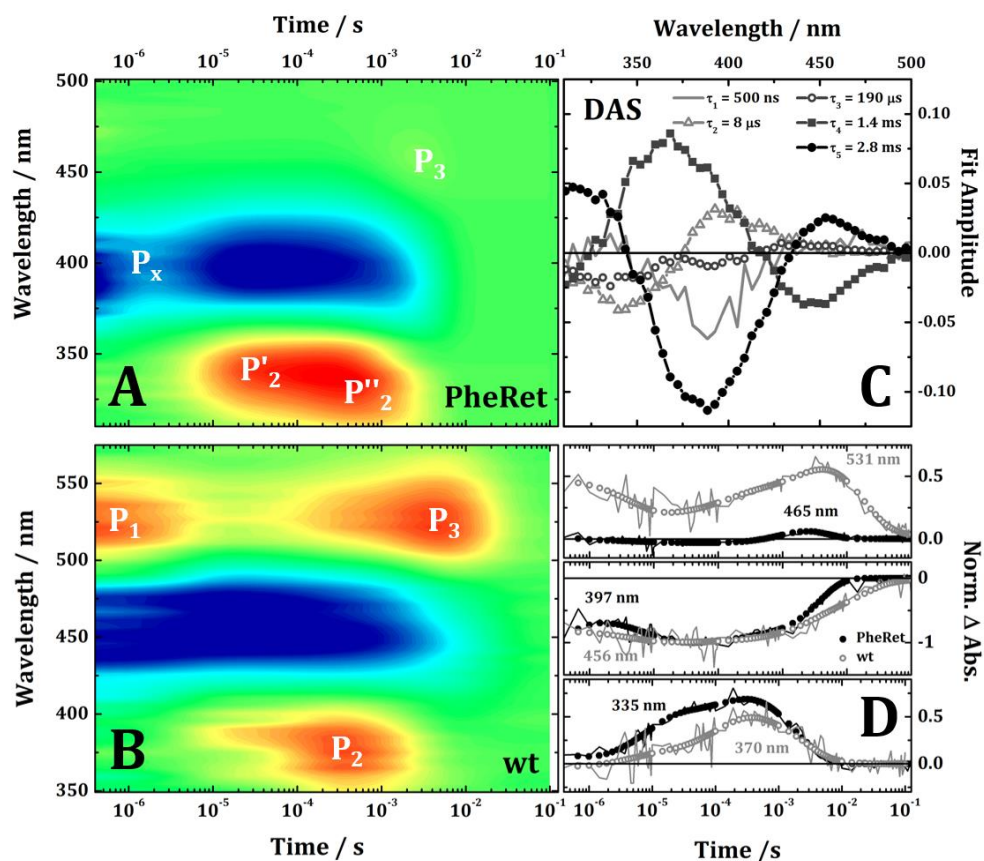


Abbildung 28: Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse-Experimente an ChR-2 mit PheRet (A) und ATR (B) als Chromophor. Rot stellt positive, blau negative und grün keine Absorptionsänderung dar. Die Zeitachse ist logarithmisch aufgetragen. C) Die Amplitudenspektren (hier: DAS) von PheRet in ChR-2 der durch die globale Fitanalyse gewonnenen Zeitkonstanten. D) Einzeltransienten von ChR-2 mit PheRet (schwarz) und ATR (grau) zu ausgewählten Wellenlängen. Die gepunkteten Linien stellen jeweils den Fit dar. Die Zeitachsen sind logarithmisch dargestellt.

Diese Zeitkonstanten entsprechen den für den Wildtyp ermittelten Bildungszeiten von  $P_2$ . Das  $P'_2$ -Intermediat wird mit der Zeitkonstante  $\tau_4 = 1,4$  ms abgebaut und es bildet sich der  $P_3$ -Zustand mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm. Die weiteren Schritte der Photoreaktion verlaufen jedoch im ChR-2 mit geblocktem Phenylretinal ganz anders als im Wildtyp. Im Gegensatz zum all-*trans*-Retinal wird das  $P_3$ -Intermediat im PheRet nur in geringer Konzentration akkumuliert und ist dabei sehr kurzlebig. Bereits mit der Zeitkonstante  $\tau_5 = 2,8$  ms geht es beim gleichzeitigen Abbau des von  $P''_2$ -Intermediats in den Ausgangszustand zurück. Somit ist die Gesamtdauer des Photozyklus von ChR-2 mit einem 9,12-Phenylretinal wesentlich kürzer als mit einem all-*trans*-Retinal (Millisekunden im Vergleich zu einigen Sekunden).[67,70]

### 4.4.5 Diskussion

Spektroskopische Untersuchungen an Channelrhodopsin-2 mit einem modifizierten 9,12-Phenylretinal weisen bei allen hier verwendeten Methoden deutliche Unterschiede zu ChR-2 mit einem all-*trans*-Retinal auf. Bereits das statische Absorptionsspektrum des Retinal-Analogons ist um etwa 50 nm blauverschoben, ausgehend vom mittleren Maximum des ATR bei 448 nm. Da der so genannte Opsin-Shift im PheRet erhalten bleibt, ist diese hypsochrome Verschiebung der Absorption ausschließlich auf das veränderte  $\pi$ -Elektronensystem des modifizierten Retinals zurückzuführen. Die Schwingungsfeinstruktur, die das all-*trans*-Retinal im ChR-2 auszeichnet, ist im PheRet nicht vorhanden. Die wahrscheinlich dafür verantwortliche inhomogene Verbreiterung kann durch die größere, durch den Phenylring verursachte sterische Störung und damit verbundene Destabilisierung der Geometrie in der Bindetasche erklärt werden, die zu Abstandsfluktuationen zwischen der Schiff-Base und dem Gegenion führt.[114][115]

Die erste Photoreaktion nach der Anregung des 9,12-Phenylretinals unterscheidet sich ebenfalls signifikant von der Primärreaktion des ChR-2 mit einem all-*trans*-Retinal. Der mit einem Phenyl-Ring „geblockte“ Chromophor zeigt einen ungewöhnlich langlebigen angeregten Zustand mit einer stark verzögerten Produktbildung. Das transiente Absorptionsspektrum ist dominiert von zwei positiven ESA-Signalen, die auf unterschiedlichen Zeitskalen zerfallen. Die ESA 1-Bande bei 630 nm zerfällt zunächst mit der Zerfallszeit  $\tau_1$  ( $\sim 200$  fs), während das ESA 2-Signal mit einem Maximum bei 470 nm mit dieser Zeitkonstante populierte wird. Die Zeitkomponente  $\tau_2 = 700$  fs zeigt positive Beiträge in beiden hier genannten Spektralbereichen und stellt somit eine gemeinsame Zerfallszeit der ESA-Signale dar. Während die Absorptionsänderung um 630 nm mit  $\tau_1$  und  $\tau_2$  auf einen Wert von Null zurückgeht, nimmt die Amplitude der ESA 2-Bande mit zwei zusätzlichen Zeitkonstanten von 4 ps und 165 ps weiter ab. Die gemeinsame Zerfallszeit  $\tau_2$  sowie ein kompliziertes multiexponentielles Zerfallsmuster bei 470 nm stellen allerdings eine Schwierigkeit bei der Interpretation des Messergebnisses dar

und können nur schwer mit einem der gängigen Reaktionsmodelle beschrieben werden. Die Tatsache, dass bei der *pump-probe*-Messung an ChR-2 mit einem modifizierten Retinal keine stimulierte Emission detektiert werden konnte und das stationäre Fluoreszenzspektrum ein breites Signal bei 480 nm zeigt, legt die Vermutung nahe, dass die Absorption des angeregten Zustandes, die für ein sehr breites positives Signal im transienten Absorptionsspektrum verantwortlich ist, durch das negative Signal der stimulierten Emission überlagert wird. Um dies zu überprüfen, wurde in Zusammenarbeit mit Peter Eberhardt und Dr. Markus Braun aus der Arbeitsgruppe Wachtveitl an der Goethe Universität Frankfurt unter Verwendung des Computerprogramms MATLAB (R2013a, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) eine Simulation der zeitaufgelösten Daten angefertigt. Die Grundlage für die Simulation bildet das von Verhoeven et al. für die Beschreibung der Primärreaktion von ChR-2 vorgeschlagene Reaktionsmodell. Nach diesem Modell sind die Ereignisse innerhalb der ersten einhundert Femtosekunden durch eine Wellenpaketsbewegung auf der  $S_1$ -Potentialfläche entlang der Streckkoordinate dominiert.[68] Die Bewegung aus der Franck-Condon-Region führt zu einer bereits für Bacteriorhodopsin und Proteorhodopsin beobachteten dynamischen Stokes-Verschiebung, die im transienten Absorptionsspektrum eine Rotverschiebung des Signals der stimulierten Emission sowie eine Blauverschiebung der ESA-Bande bewirkt.[116,117] Um diesen Vorgang zu simulieren, wurden zunächst zwei Gauss-Funktionen im Spektralbereich zwischen 300 nm und 800 nm (500 Schritte) gebildet, die das positive und negative Signal zum Zeitnullpunkt darstellen sollen:

$$y_{gauss} = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot e^{-2 \cdot \left(\frac{\lambda - \mu}{\sigma}\right)^2}, \quad (25)$$

mit  $\sigma = \frac{FWHM}{2 \cdot \sqrt{2 \cdot \log 2}}$  und  $\mu$ : Zentralwellenlänge.

Es ist dabei zu beachten, dass diese Vorgehensweise eine starke Vereinfachung darstellt und ausschließlich der modellhaften Beschreibung der ersten Ereignisse nach der Retinalanregung dient, da die beiden zu simulierenden Spektren keineswegs durch eine einfache Gauss-Funktion nachgebildet werden können. Im nächsten Schritt wurde die spektrale Verschiebung der Maxima der beiden Gauss-Kurven um 100 nm mit einer Zeitkonstante von 200 fs ( $\tau_1$ ) erzeugt:

$$y_{shift}(t) = e^{\frac{-t}{200}}. \quad (26)$$

Zusätzlich wurde der exponentielle Zerfall der beiden Signale zwischen 0 und 1 ps (1000 Schritte) nachgebildet mit:

$$y_{decay_{SE}}(t) = 5 \cdot e^{\frac{-t}{700}} \quad (27)$$

und

$$y_{decay_{ESA}}(t) = e^{\frac{-t}{700}} + 5 \cdot e^{\frac{-t}{4000}}. \quad (28)$$

Die eingesetzten Zeitkonstanten wurden dabei der globalen Fitanalyse der Experimentaldaten entnommen ( $\tau_2 = 700$  fs und  $\tau_3 = 4$  ps) und die Amplituden schrittweise angepasst. Weitere verwendete Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Die für die Simulation des *pump-probe*-Datensatzes von PheRet in ChR-2 verwendeten Parameter.

	SE	ESA
Skalierung	-1	5
$\mu$	450 nm	640 nm
FWHM	100 nm	320 nm
$\tau_{\text{shift}}$	200 fs	200 fs
$\tau_{\text{decay}}$	700 fs	700 fs, 4 ps

Die Summe aus den daraus resultierenden transienten Spektren ist in Abbildung 29 dargestellt. Aufgrund der Tatsache, dass viele der für die Simulation benötigten Parameter wie z.B. die Zentralwellenlänge, die Halbwertsbreite (FWHM<sup>48</sup>) und das Amplitudenverhältnis der beiden Spektren sowie die tatsächliche Kurvenform und die Amplituden der eingesetzten Zeitkonstanten nicht genau bestimmt werden konnten, kann das im Experiment aufgenommene transiente Spektrum nicht exakt nachgestellt werden. Dennoch zeigt Abbildung 29 deutlich zwei separate positive Signale mit einem unterschiedlichen Zerfallsverhalten innerhalb der ersten Pikosekunde. Durch die Überlagerung mit dem negativen Signal und der gleichzeitigen spektralen Verschiebung der beiden Banden entsteht der Eindruck, dass die Bildung der positiven Bande um 500 nm mit der schnellen Amplitudenabnahme des zweiten Signals bei 630 nm einhergeht. Somit kann festgehalten werden, dass das für den Wildtyp vorgeschlagene Modell durchaus auch auf das 9,12-Phenylretinal angewandt werden kann.[68] Dies könnte durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen bestätigt werden.

<sup>48</sup> Full Width at Half Maximum (eng.)



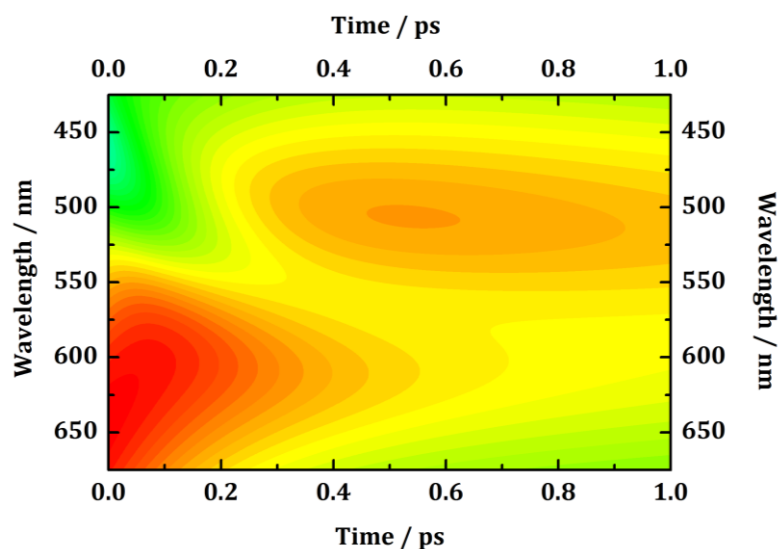


Abbildung 29: Das Ergebnis der Simulation des *pump-probe*-Datensatzes von ChR-2 mit PheRet als Chromophor.

Die Bildung eines Photoprodukts nach der Anregung des 9,12-Phenylretinals in ChR-2 ist an sich überraschend, wenn man berücksichtigt, dass in Bacteriorhodopsin kein Photoprodukt detektiert werden konnte. Während das modifizierte Retinal in Isopropanol zu 67% nach *13-cis* isomerisiert, ist die Isomerisierung des Chromophors innerhalb der Bindetasche von BR, die eine Rotation um die C12-C13-Einfachbindung erfordert, aufgrund einer sterischen Hinderung der beiden Protonen an C12 und C15 nicht möglich.[90] Bei ChR-2 führt diese sterische Hinderung zu einer deutlichen Verlangsamung der Isomerisierungsreaktion. Wie aus den Amplitudenspektren in Abbildung 27 A ersichtlich ist, zeigen die Zeitkonstanten  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  und  $\tau_4$  deutliche Beiträge im Spektralbereich des Grundzustandsbleichens und beschreiben somit den Rückgang in den Grundzustand des nicht-isomerisierten PheRet. Nichtsdestotrotz ist die Frage, welche der Zeitkomponenten zur Produktbildung beiträgt, schwierig zu beantworten. Unter der Annahme eines einzelnen ESA-Signals wurde daher der Versuch unternommen, mit Hilfe einer Differenzbildung aus zwei Transienten bei einer Wellenlänge von 451 nm, bei der die Bildung der Produktbande zu sehen ist, und 511 nm, die ausschließlich den ESA-Zerfall beschreibt, das durch die Entstehung des Photoprodukts

induzierte Signal zu ermitteln. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt. Die anschließende exponentielle Anpassung der Doppeldifferenzbande liefert eine Zeitkonstante von  $\sim 165$  ps. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Bildung des Photoprodukts mit der Zeitkomponente  $\tau_4$  erfolgt. Die Schwierigkeit besteht allerdings darin, dass das DAS von  $\tau_4$  eine positive Amplitude zwischen 430 nm und 560 nm zeigt. Da aber das Maximum des DAS von  $\tau_4$  im Vergleich zum  $\tau_3$ -Maximum eine deutliche Rotverschiebung in diesem Spektralbereich aufweist, ist eine Überlagerung mit dem negativen Beitrag im Bereich der Produktbande nicht auszuschließen. Ob die Zeitkonstante  $\tau_3 = 4$  ps einen langsamen  $S_1$ -Deaktivierungspfad oder, wie in der Simulation angenommen, den Kühlprozess der heißen Grundzustandspopulation beschreibt, könnte mit Hilfe zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen festgestellt werden.

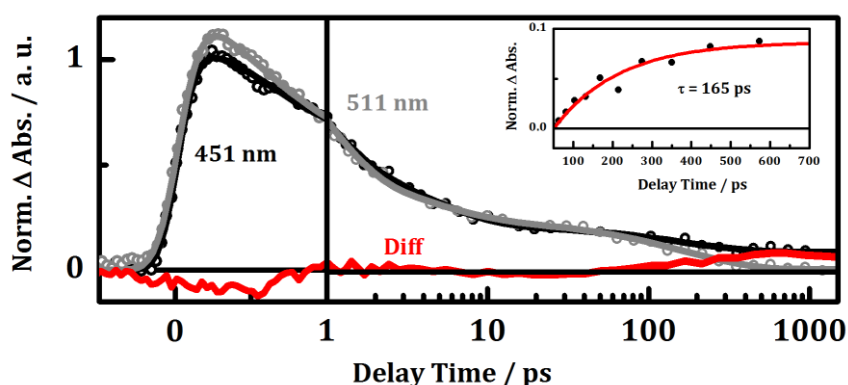


Abbildung 30: Einzeltransienten von PheRet in ChR-2 bei 451 nm (schwarz) und 511 nm (grau) sowie die Differenz aus den beiden Transienten (rot). Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch dargestellt. Die Differenzkurve wurde zusätzlich mit einer Zeitkonstante  $\tau = 165$  ps angepasst.

Unter Berücksichtigung der Simulationsannahmen und der Tatsache, dass das 9,12-Phenylretinal in einer *all-trans*-Konformation nach einer Anregung in Isopropanol vorzugsweise zu einem 13-*cis*-Isomer reagiert, konnte das Ergebnis der *pump-probe*-Messung in einem in Abbildung 31 schematisch dargestellten Modell zusammengefasst werden. Während der ersten 200 fs nach der Anregung des modifizierten Retinals findet aufgrund einer Wellenpaketsbewegung auf der  $S_1$ -Potentialfläche aus der Franck-Condon-

Region eine Blauverschiebung der Absorption des angeregten Zustands mit einer gleichzeitigen ultraschnellen Stokes-Verschiebung statt ( $\tau_1$ ). Die anschließende Relaxation entlang der  $S_1$ -Potentialfläche, die eine Streckkoordinate und eine Torsionskoordinate um die C12-C13-Bindung beinhaltet, führt zu einer konischen Durchschneidung ( $\tau_2$ ). Beim anschließenden Kühlprozess kann aufgrund der langen Dauer und der Anzahl der diesen Prozess beschreibenden Zeitkonstanten die Bildung verschiedener Retinal-Konformationen angenommen werden. Hiernach kehrt der Großteil der Moleküle in den all-*trans*-Grundzustand zurück, während ein kleiner Teil zu einem 13-*cis*-Phenylretinal isomerisiert ( $\tau_3, \tau_4$ ).

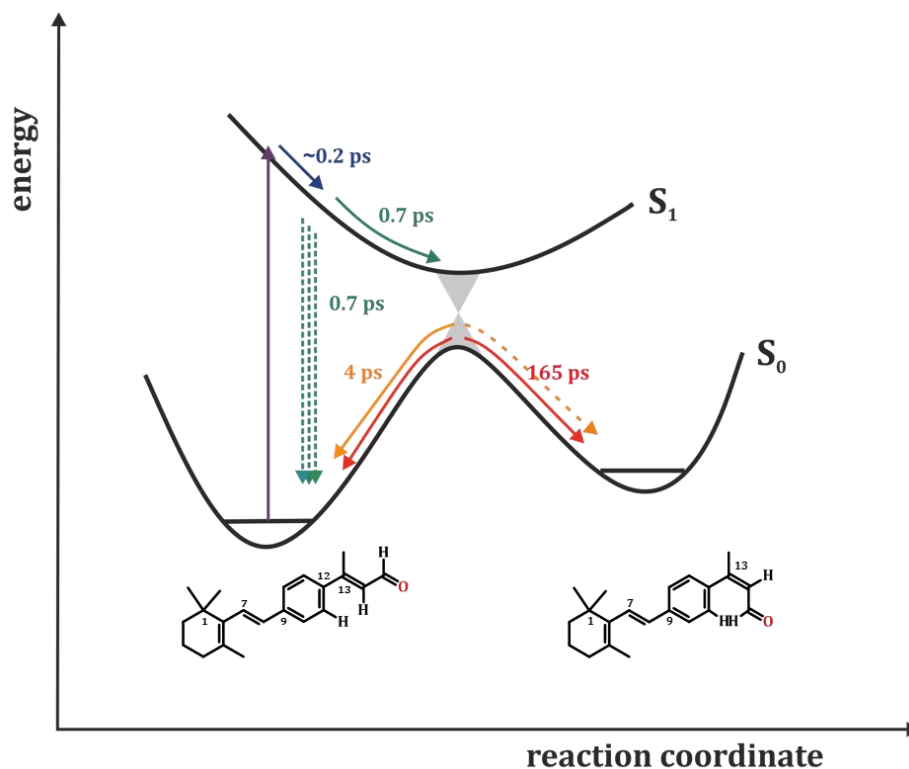


Abbildung 31: Reaktionsmodell der Primärreaktion von 9,12-Phenylretinal in ChR-2 nach einer Anregung bei 387 nm.

Die weiteren Schritte des so genannten Photozyklus von ChR-2 mit einem „geblockten“ Retinal unterscheiden sich ebenfalls signifikant von denen des nicht modifizierten Proteins. Besonders bemerkenswert ist der schnelle Zerfall des  $P_1$ -Intermediates unter Bildung eines für ChR-2 bisher nicht beobachteten

$P_x$ -Zustandes. Dieses neue Intermediat zeigt im Vergleich zu  $P_1$  eine um etwa 100 nm blauverschobene Absorption und zerfällt mit der Zeitkonstante  $\tau_2 = 8 \mu\text{s}$  zum Zustand  $P'_2$ . Um genau festzustellen, welche Konformation und welchen Protonierungszustand das Retinal im  $P_x$ -Zustand besitzt, sind Tieftemperaturexperimente im IR-Bereich notwendig. Dennoch sind Parallelen zu einem in Bacteriorhodopsin detektierten L-Intermediat festzustellen. Dieses ist durch eine Verdrillung der C15=N- und C13=C14-Doppelbindungen des Retinals gekennzeichnet. Die Schiff-Base liegt zwar noch protoniert vor, doch die Bildung des L-Intermediats gilt als Vorstufe der Deprotonierungsreaktion und ist mit Veränderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk innerhalb der Bindetasche und einer Blauverschiebung des Absorptionsspektrums verbunden. [13,118,119]

Die Bildungs- und Abbauzeiten der beiden  $P_2$ -Intermediate, bei denen die Schiff-Base deprotoniert vorliegt, sind bei beiden untersuchten Proteinen sehr ähnlich (siehe schematische Darstellung der Photozyklen in Abbildung 32). Allerdings reagiert im Falle von ChR-2 mit einem „geblockten“ Retinal nur ein kleiner Anteil der Moleküle weiter zum  $P_3$ -Zustand, während der Großteil mit einer Zeitkonstante von 2.8 ms zum Ausgangszustand zurückkehrt. Somit wird das  $P_3$ -Intermediat nur in geringen Mengen gebildet und reisomerisiert anschließend sehr schnell zu einem all-*trans*-Retinal. Das  $P_4$ -Intermediat konnte bei beiden Proben nicht detektiert werden.

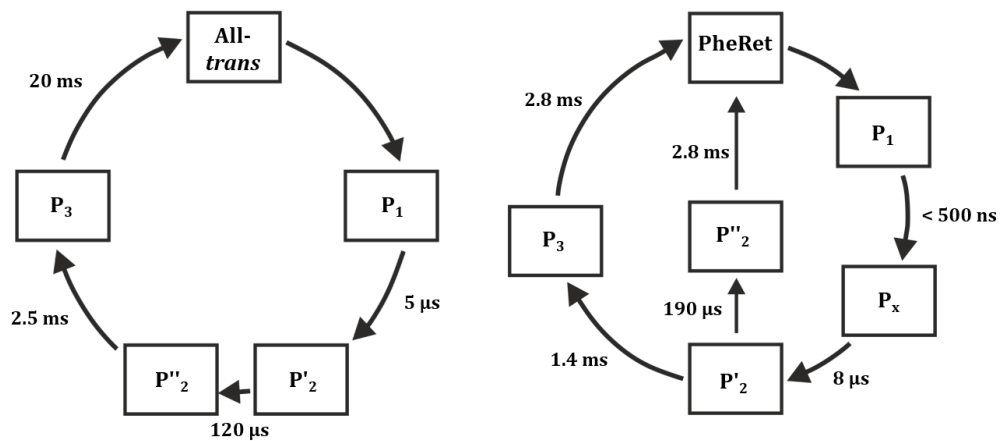


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Photozyklen des all-*trans*-Retinals (links) und des 9,12-Phenylretinals (rechts) in ChR-2.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die all-*trans*-Form des 9-12-Phenylretinals in ChR-2 eindeutig bevorzugt ist. Doch trotz eines deutlich verschiedenen Photozyklus ist die Tatsache, dass nach der UV-Anregung eine Isomerisierung des mit einem Phenylring „geblockten“ Retinals stattfinden kann, ausreichend, um die Öffnung des Kanals auszulösen und somit die Funktion des Proteins intakt zu halten.

## 5 Proteorhodopsin

### 5.1 Einleitung

Proteorhodopsin gehört zu der Familie der mikrobiellen Rhodopsine (Typ I Rhodopsine) und wurde als erster Vertreter bakterieller Retinalproteine im Jahre 2000 im  $\gamma$ -Proteobakterium in der Monterey Bay in Kalifornien entdeckt.[16,17] Seitdem wurde eine Vielzahl an Proteorhodopsin-Varianten in verschiedenen Gewässern der Erde gefunden.[120–123] Sie fungieren als lichtgetriebene Protonenpumpen und dienen somit der Energiegewinnung (Phototrophie) der Zelle.[124,125] Alle Proteorhodopsine bestehen aus sieben Transmembranhelices und besitzen ein an einen Lysin-Rest kovalent gebundenes Retinal als Chromophor. Aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften unterscheidet man zwei Gruppen der Proteorhodopsine: die grünabsorbierenden ( $\lambda_{\text{Abs.}} = 525 \text{ nm}$ ) und die blauabsorbierenden Proteorhodopsine ( $\lambda_{\text{Abs.}} = 490 \text{ nm}$ ). Während die blauabsorbierende Variante (BPR) hauptsächlich in tieferen Meeresregionen nachgewiesen werden konnte, sind die Vertreter der ersten Klasse im oberen Bereich der euphotischen Zone, der auch von längerwelligen Komponenten des Sonnenlichts erreicht werden kann, vorzufinden.[126,127] Den Unterschied auf molekularer Ebene stellt der Aminosäurerest in Position 105 dar, die im Falle des grünabsorbierenden Proteorhodopsins (GPR) durch einen Lysin- und beim BPR durch einen Glutamin-Rest besetzt ist. So kann durch eine L/Q-Punktmutation das GPR in die blauabsorbierende Form überführt werden.[128,129] In dieser Arbeit wurde ausschließlich das grünabsorbierende Proteorhodopsin untersucht.

Während für das BPR die Kristallstruktur auf atomarer Ebene bereits vor einigen Jahren aufgeklärt werden konnte,[130] gibt es für das GPR lediglich Homologiemodellierungen zur Kristallstruktur von Bacteriorhodopsin (BR)[18,127] sowie eine auf NMR<sup>49</sup>-Daten basierende Kristallstruktur[131]. Die

---

<sup>49</sup> Nuclear Magnetic Resonance (eng.)

---

Bindung des Retinal-Chromophors, welcher in einem unbelichteten Zustand zu 100% in einer all-*trans*-Konformation vorliegt,[132] zum Opsin-Gerüst erfolgt über Ausbildung einer Schiff-Base mit dem Lysin-Rest K231. In ihrer direkten Umgebung befindet sich der so genannte Gegenionenkomplex, bestehend aus den Residuen D97, D227 und R94. Das besondere Merkmal des GPR ist ein ungewöhnlich hoher pKs-Wert des primären Protonenakzeptors D97 (pKs  $\sim$  7,5).[18,133,134] Der Grund dafür ist sehr wahrscheinlich die Ausbildung einer starken Wasserstoffbrückenbindung zum Histidin-Rest H34, welcher den deprotonierten Zustand von D97 stabilisiert.[135,136]

Der Protonierungszustand des Protonenakzeptors D97 hat eine große Auswirkung auf das Absorptionsverhalten des Proteins. So konnte durch eine einfache pH-Titration das Absorptionsmaximum der GPR-Probe um etwa 20 nm verschoben werden.[18,133,134]

Neben der Rotverschiebung des Absorptionsspektrums konnte im GPR eine starke pH-Abhängigkeit des Photozyklus festgestellt werden.[18,134,137,138] Der erste Schritt des Photozyklus ist die Isomerisierung des Retinals von all-*trans* zu 13-*cis* nach der Photoanregung. Die Photoreaktion startet mit einer Wellenpaketsbewegung der angeregten Population innerhalb der ersten 150 fs aus der Franck-Condon-Region der  $S_1$ -Potentialfläche entlang der C=C-Streckkoordinate. Die anschließende Rotation um die C13-C14-Bindung führt über eine Energiebarriere zur konischen Durchschneidung (CI<sup>50</sup>) mit dem Grundzustand. Aufgrund dieser Energiebarriere landet eine Teilpopulation im lokalen Minimum der  $S_1$ -Potentialfläche, erreicht die konische Durchschneidung erst nach einigen Pikosekunden und relaxiert entweder zur ursprünglichen all-*trans*-Konfiguration oder isomerisiert zum 13-*cis*-Photoprodukt, auch K-Intermediat genannt.[116,139] Ob der direkte Reaktionspfad zur konischen Durchschneidung oder der langsame über das lokale  $S_1$ -Minimum bevorzugt wird, hängt stark vom pH-Wert der Probe ab. Diese pH-Abhängigkeit kann durch die Verkippung der  $S_1$ -Hyperfläche und eine Erhöhung der Energiebarriere im Falle eines protonierten Protonenakzeptors D97 erklärt

---

<sup>50</sup> Conical Intersection (eng.)

werden. Dies führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Primärreaktion und zur Bevorzugung des langsamen Reaktionspfades nach der Anregung.[116,140] Die Isomerisierung des Chromophors initiiert eine Reihe thermischer Prozesse wie (De-)Protonierungsreaktionen sowie konformationelle Änderungen im Protein unter Bildung verschiedener Intermediate. Diese Reaktionskaskade, auch Photozyklus genannt (siehe Abbildung 33), kann bei GPR bei einem alkalischen pH-Wert wie folgt beschrieben werden:

Das nach der Isomerisierungsreaktion gebildete  $K^{560}$ -Intermediat zerfällt auf einer Mikrosekunden-Zeitskala zu einem  $M^{400}$ -Zustand. Dies erfolgt unter Abgabe des Protons von der Schiff-Base des Retinals zum primären Protonenakzeptor D97 und ist mit einer starken Blauverschiebung des Absorptionsspektrums verbunden. Beim biexponentiellen Übergang zum  $N^{590}$ -Intermediat erfolgt die Reprotonierung der Schiff-Base durch den Protonendonator E108 bei gleichzeitiger Freisetzung eines Protons zur extrazellulären Proteinseite. Nach anschließender Reisomerisierung des Chromophors und Reprotonierung von E108 ( $O^{590}$ -Intermediat) kehrt Proteorhodopsin unter Deprotonierung von D97 zum ursprünglichen Dunkelzustand  $D^{520}$  zurück.[18,134,137,138,141]

Bei einem niedrigen pH-Wert ( $\text{pH} < 7$ ) konnte bei spektroskopischen Untersuchungen der Reaktionsdynamik bei Raumtemperatur kein M-Intermediat detektiert werden.[18,142,143] Erst bei Tieftemperatur-experimenten konnte die Akkumulierung des M-Zustands im sauren Milieu nachgewiesen werden.[138] Während die Änderung des pH-Wertes keinen signifikanten Einfluss auf die Dauer des Photozyklus hat, stellte man durch elektrophysiologische Untersuchungen eine Umkehr der Protonenpumprichtung fest.[18,19]



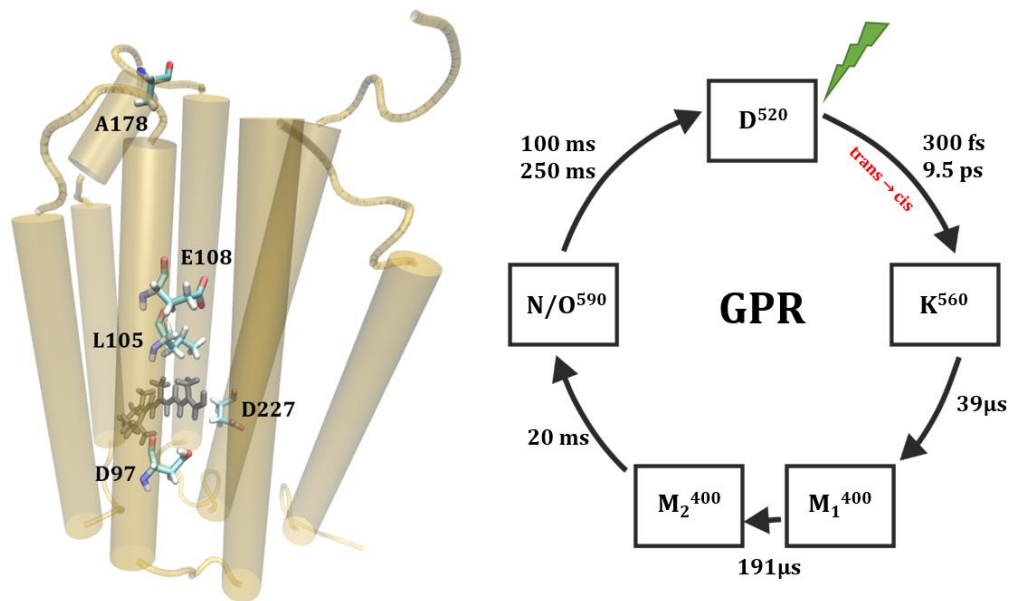


Abbildung 33: Struktur des grünabsorbierenden Proteorhodopsins (links)[131] sowie die schematische Darstellung seines Photozyklus bei einem pH-Wert von 9 (rechts)[141].

Die pH-Abhängigkeit des Absorptionsmaximums sowie das unterschiedliche Absorptionsverhalten der einzelnen Intermediate im Photozyklus sind allgemein auf die Änderungen in der direkten Retinalumgebung wie zum Beispiel den Protonierungszustand des primären Protonenakzeptors zurückzuführen. Umso überraschender war die Erkenntnis, dass der Austausch des Alanin-Restes in Position 108, welcher etwa 24 Å vom Retinal entfernt ist und sich innerhalb der E-F-Schleife befindet, durch ein Arginin zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums um etwa 20 nm führt. Dieser Effekt, allgemein „*color tuning*“-Effekt genannt, ist sehr positionsspezifisch und konnte bisher bei Bacteriorhodopsin nicht beobachtet werden.[144–146] Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen an der A178R-Mutante zeigten außerdem eine deutliche Verlangsamung der Primärreaktion und des gesamten Photozyklus (10-fach langsamer im Vergleich zum Wildtyp). Mit Hilfe der ssNMR<sup>51</sup>-Methode konnten strukturelle Änderungen im gesamten Protein,

<sup>51</sup> Solid-State Nuclear Magnetic Resonance

die sich bis zur Retinalbindetasche erstrecken, gezeigt und somit eine Interaktion der Retinalumgebung mit der E-F-Schleife festgestellt werden.[141] Abschließend kann festgehalten werden, dass Proteorhodopsin aufgrund der hier beschriebenen Eigenschaften ein verlässliches Modellsystem zur Untersuchung des „*color tuning*“-Effekts der Retinalproteine sowie möglicher Mechanismen der spektralen Anpassung von Mikroorganismen an ihren Lebensraum darstellt.

## 5.2 Fluoreszenz und Primärreaktion des Retinals mit deprotonierter Schiff-Base

Die Bildung des M-Intermediats im GPR bei einem alkalischen pH-Wert während des Photozyklus erfolgt über den Protonentransfer von der Schiff-Base des Chromophors zum Protonenakzeptor D97 und ist mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 400 nm verbunden.[18,134,137,141,147] Vor einigen Jahren konnte allerdings gezeigt werden, dass im alkalischen Milieu im Dunkelzustand des GPR neben dem all-*trans*-Retinal mit protonierter Schiff-Base eine weitere Spezies mit einem Absorptionsmaximum bei 360 nm existiert. Bei dieser Spezies handelt es sich um ein Retinal mit deprotonierter Schiff-Base. Jedoch im Gegensatz zum M-Intermediat ist der primäre Protonenakzeptor D97 deprotoniert und die Deprotonierung der Schiff-Base erfolgt alleine durch Erhöhung des pH-Wertes der Probe. [133,148]

In diesem Kapitel werden Ergebnisse spektroskopischer Untersuchungen des Retinals mit deprotonierter Schiff-Base in GPR präsentiert. Es werden die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen dargestellt sowie Untersuchungen der Primärreaktion in Bezug auf eine mögliche Retinalisomerisierung diskutiert und in einem Reaktionsmodell zusammengefasst.

Die erzielten Ergebnisse sind in der Publikation [149] veröffentlicht:

E. Bühl, M. Braun, A. Lakatos, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, Fluorescence and excited state dynamics of the deprotonated Schiff base retinal in proteorhodopsin, *Biol. Chem.*, 396 (2015) 1109-1115.

### 5.2.1 Probenpräparation und Experimentelles

Die pH-abhängigen **stationären Absorptionsmessungen** wurden unter Verwendung des Spektrometers Specord S600 (Analytik Jena, Jena) in einer (10 x 10) mm Quarzküvette durchgeführt. Die Probe, bereitgestellt von Dr. Andrea Lakatos (AG Glaubitz, Goethe Universität, Frankfurt am Main), wurde in

einem zusammengesetzten Puffer aus 50 mM TRIS<sup>52</sup>-Puffer, 50 mM Citrat-Puffer, 50 mM Natriumphosphat, 50 mM Borsäure, 100 mM Natriumchlorid-Lösung und 0,1 % DDM<sup>53</sup> solubilisiert. Die pH-Werte wurden durch Zugabe konzentrierter Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt und mit Hilfe des pH-Meters pH 320 SET (WTW GmbH, Weilheim) aufgenommen.

Bei **stationären Fluoreszenzmessungen** wurden abhängig vom pH-Wert zwei verschiedene Puffer verwendet. Bei einem pH-Wert von 9 wurde die Probe in einem TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 0.1% DDM) gelöst, während für die Messungen bei einem pH-Wert von 5 ein Citrat-Puffer (50 mM Natriumcitrat,

50 mM NaCl, 0.1 % DDM) verwendet wurde. Die Messungen wurden an einem Fluorimeter des Typs FP-8500 (Jasco Analytical Instruments, Easton, MD, USA) in einer (2 x 10) mm Fluoreszenzküvette durchgeführt. Die optische Dichte der Probe im Absorptionsmaximum wurde auf den Wert von 0,1 (bei  $d = 2$  mm) eingestellt. Die Fluoreszenz wurde zwischen 400 nm und 800 nm aufgenommen, während die Anregungswellenlänge in 5 nm Schritten zwischen 300 nm und 600 nm variiert wurde. Anschließend wurden die Daten um die Lösungsmittelsignale, Reabsorptionseffekte sowie spektrale Eigenschaften des Anregungslichts und des Detektionssystems korrigiert.

Für **transiente Absorptionmessungen** wurden ebenfalls abhängig vom pH-Wert zwei Puffer verwendet (TRIS-Puffer bei  $\text{pH} = 9$ , Citrat-Puffer bei  $\text{pH} = 5$ ). Die Messung erfolgte in einer 1 mm Quarzküvette bei einer optischen Dichte der Probe von 0,2 im Absorptionsmaximum. Für die Anregung im sichtbaren Spektralbereich wurde das Clark MXR-CPA-2001 Lasersystems (Horiba Jobin Yvon GmbH, Bensheim) verwendet. Der Messaufbau ist in 3.1.3 beschrieben. Angeregt wurde die Probe mit einem Laserpuls der Wellenlänge von 520 nm bzw. 540 nm (NOPA) und Pulsenergien von  $\sim 80$  nJ. Für die Abtastung wurde in einem Saphir-Kristall generiertes Weißlicht verwendet. Der Polarisationswinkel

---

<sup>52</sup> Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

<sup>53</sup> *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid

zwischen den beiden Pulsen wurde auf  $54,7^\circ$  („magischer Winkel“) eingestellt. Die spektrale Auflösung des Experiments betrug 4 nm mit einer zeitlichen Auflösung von  $\sim 150$  fs. Für die Kurzzeitmessungen mit UV-Anregung wurde das Lasersystem Clark MXR-CPA-iSeries (Horiba Jobin Yvon GmbH, Bensheim) eingesetzt. Die Wellenlänge des Anregungspulses wurde dabei über einen SFG-Prozess auf 360 nm eingestellt, während für die Abtastung in einem  $\text{CaF}_2$ -Plättchen erzeugtes Weißlicht verwendet wurde. Die spektrale Auflösung des Experiments betrug 6,3 nm mit einer zeitlichen Auflösung von  $\sim 200$  fs. Die Datenauswertung erfolgte unter Verwendung des Analyseprogramms OPTIMUS.[59] Abbildung 35 wurde zusätzlich mit Hilfe des Programms z20 erstellt.

### 5.2.2 Stationäre Charakterisierung

Abbildung 34 zeigt pH-abhängige Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Proteorhodopsin. Neben einer spektralen Verschiebung der Hauptabsorptionsbande von 543 nm zu 519 nm [18] erkennt man die Bildung einer zusätzlichen UV-Bande bei 365 nm bei steigendem pH-Wert. Basierend auf vorangegangenen Publikationen [133,148] kann die UV-Absorption dem Retinal mit deprotonierter Schiff-Base zugeordnet werden. Nach einer Titration zu pH 5 geht die Bande zurück und es bleibt eine Restabsorption, die auf den  $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang des all-*trans*-Retinals mit protonierter Schiff-Base zurückgeführt werden kann.[150] Dies kann anhand der anregungswellenlängenabhängigen Fluoreszenzspektren verdeutlicht werden. Bei einem pH-Wert von 5 führt die Anregung der Probe im Bereich der beiden Absorptionsbanden zu einer einzigen Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei 730 nm. Bei einem pH-Wert von 9 hingegen zeigt das wellenlängenabhängige Fluoreszenzspektrum zwei Banden bei 705 nm und 620 nm, was auf das Vorhandensein zweier Spezies, nämlich des Retinals mit protonierter und mit deprotonierter Schiff-Base, zurückgeführt werden kann.

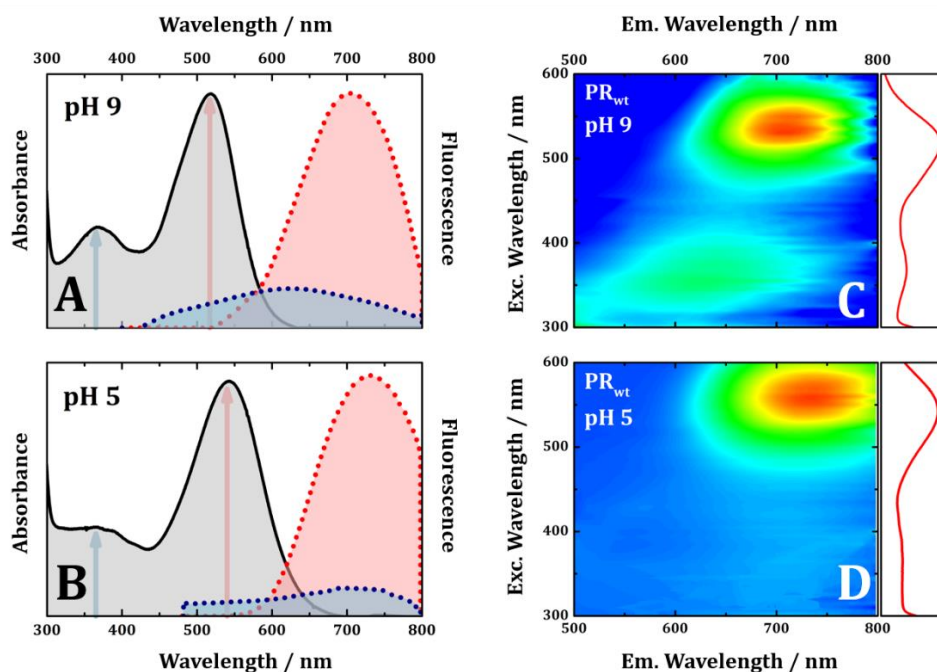


Abbildung 34: Absorptionsspektren von GPR bei pH-Werten von 9 (A) und 5 (B) sowie Fluoreszenzspektren nach einer Anregung im Hauptabsorptionsmaximum (rot) und bei 360 nm (blau). (C-D) Wellenlängenabhängige Fluoreszenzspektren vom grünabsorbierendem Proteorhodopsin (im Bild als PR<sub>wt</sub> abgekürzt) bei zwei verschiedenen pH-Werten.

### 5.2.3 Primärreaktion des Retinals mit deprotonierter Schiff-Base

Die zeitaufgelösten Absorptionmessungen an Proteorhodopsin wurden bei den zwei pH-Werten von 9 und 5 bei jeweils zwei verschiedenen Anregungswellenlängen durchgeführt. Die Anregung erfolgte im Bereich der vis-Absorptionsbande bei 520 nm für pH = 9 und bei 540 nm für pH = 5 sowie im Bereich der UV-Absorption bei 360 nm für beide pH-Werte. Die Messungen im sichtbaren Spektralbereich sind bereits in [116] beschrieben und wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wiederholt durchgeführt. Abbildung 35 zeigt transiente Absorptionsänderungen nach der Retinalanregung, dargestellt als Farbplots. Bei einem pH-Wert von 9 konnten beim Proteorhodopsin nach einer Anregung bei 520 nm vier verschiedene Signale detektiert werden (siehe Abbildung 35 A). Bereits direkt nach der Anregung ist zwischen 450 nm und 550 nm ein positives Signal der Absorption des

angeregten Zustands (ESA) zu erkennen, welches innerhalb einiger Picosekunden zerfällt. Ein ähnliches Verhalten zeigt die negative Bande zwischen 550 nm und 750 nm, die der stimulierten Emission (SE) zugeordnet werden kann. Das Bleichsignal des Grundzustandes (GSB) zwischen 450 nm und 520 nm wird innerhalb der ersten 10 ps gebildet und bleibt bei längeren Verzögerungszeiten konstant. Die positive Absorptionsänderung bei 600 nm am Ende der Messzeit kann der Absorption des ersten Photoprodukts (K-Intermediat) zugeordnet werden. Im sauren Milieu führt die Anregung im Hauptabsorptionsmaximum zu spektral verschobenen Signalen, die hauptsächlich aus der pH-Abhängigkeit der Retinalabsorption in Proteorhodopsin resultieren (Abbildung 35 B). Außerdem kann im Vergleich zur alkalischen Probe eine verlängerte Lebensdauer des angeregten Zustands sowie eine verlangsamte und weniger effiziente Bildung des Photoprodukts beobachtet werden.[116]

Das transiente Absorptionsspektrum von PR nach der UV-Anregung zeigt bei einem pH-Wert von 5 eine ähnliche spektrale Signatur, wie nach Anregung im sichtbaren Spektralbereich (Abbildung 35 D). Das ESA-Signal ist etwas intensiver und spektral breiter, was möglicherweise auf die kleinere Amplitude der GSB-Bande zurückgeführt werden kann. Zusätzlich kann eine weitere GSB-Bande am „blauen“ Ende des Spektrums detektiert werden. Dieses Signal ist jedoch klein und zerfällt bereits bei Verzögerungszeiten von unter einer Picosekunde, was auf eine Relaxation aus einem höher angeregten Zustand hindeutet. Im Gegensatz dazu weist das transiente Absorptionsspektrum bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 360 nm wesentliche Unterschiede zur Anregung im sichtbaren Spektralbereich auf (siehe Abbildung 35 C, Absorptionsänderungen zu ausgewählten Verzögerungszeiten sind in Abbildung 36 A dargestellt). Bei etwa 490 nm und 580 nm sind zwei dominante positive Signale zu sehen. Diese Banden zerfallen nach einigen hundert Picosekunden und resultieren in einem negativen Signal bei 550 nm sowie einer kleinen Photoproduktbande. Außerdem zeigt das Endspektrum im Bereich der

UV-Absorption des Retinals eine kleine negative Amplitude. Das Signal der stimulierten Emission konnte nicht detektiert werden.

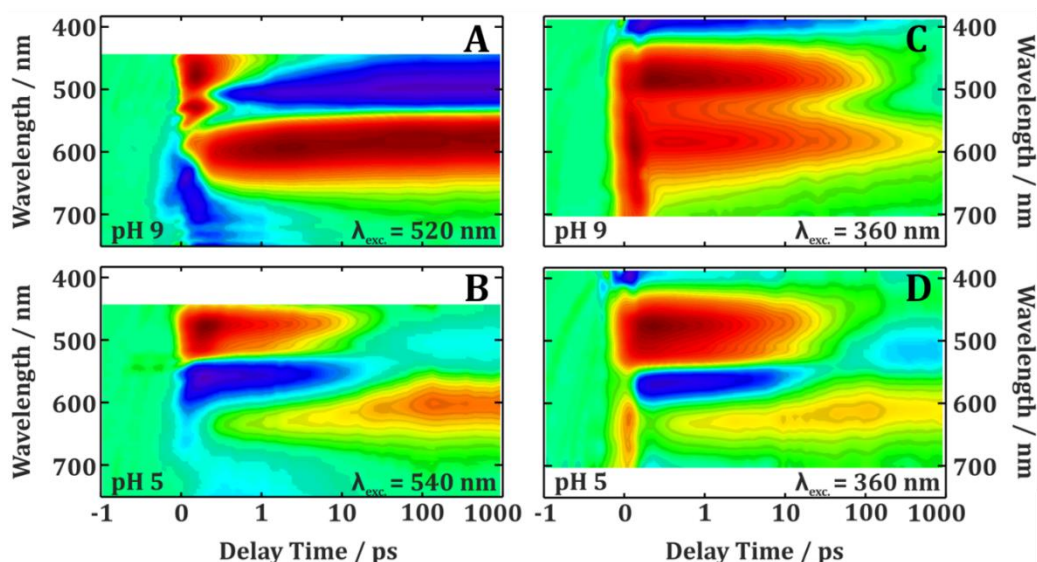


Abbildung 35: Transiente Absorptionsspektren von GPR bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 520 nm (A) und 360 nm (C) sowie bei einem pH-Wert von 5 nach einer Anregung bei 540 nm (B) und 360 nm (D).

Zur besseren Interpretation der Messergebnisse wurden die Daten mit einer Summe aus exponentiellen Zerfallsfunktionen unter Verwendung der globalen Fit-Analyse angepasst. In Abbildung 36 sind die Absorptionsänderungen zu ausgewählten Verzögerungszeiten sowie die zerfallsassoziierten Spektren (DAS) von PR bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 360 nm und 520 nm dargestellt. Die Einzeltransienten zu ausgewählten Wellenlängen der beiden Messungen sind in Abbildung 37 zu sehen. Die dargestellten Datensätze wurden auf die Photoproduktabsorption bei 600 nm bei einer Verzögerungszeit von 1 ns normiert. Die Daten nach der Anregung bei 520 nm (pH = 9) konnten mit vier Zeitkonstanten angepasst werden. In Anlehnung an [116] kann die  $\tau_1$ -Komponente mit einer Bewegung aus der Franck-Condon-Region auf der  $S_1$ -Potentialfläche assoziiert werden. Allerdings liegt diese Zerfallszeit innerhalb der Zeitauflösung des Experiments und ist durch kohärente Artefakte überlagert. Die Absorption des angeregten Zustands zerfällt biexponentiell mit den zwei Zeitkonstanten  $\tau_2 = 0,3$  ps und  $\tau_3 = 10$  ps. Die Photoproduktabsorption



wird bei 600 nm detektiert, während ein Teil der Moleküle in den Grundzustand zurückfällt. Das Amplitudenspektrum der  $\tau_4$ -Zeitkonstante ( $\tau_4 = \infty$ ) stellt das Spektrum am Ende der Messzeit dar und zeigt die Absorptionsbande des K-Intermediats sowie das negative Bleichsignal des Grundzustandes des all-*trans*-Retinals.

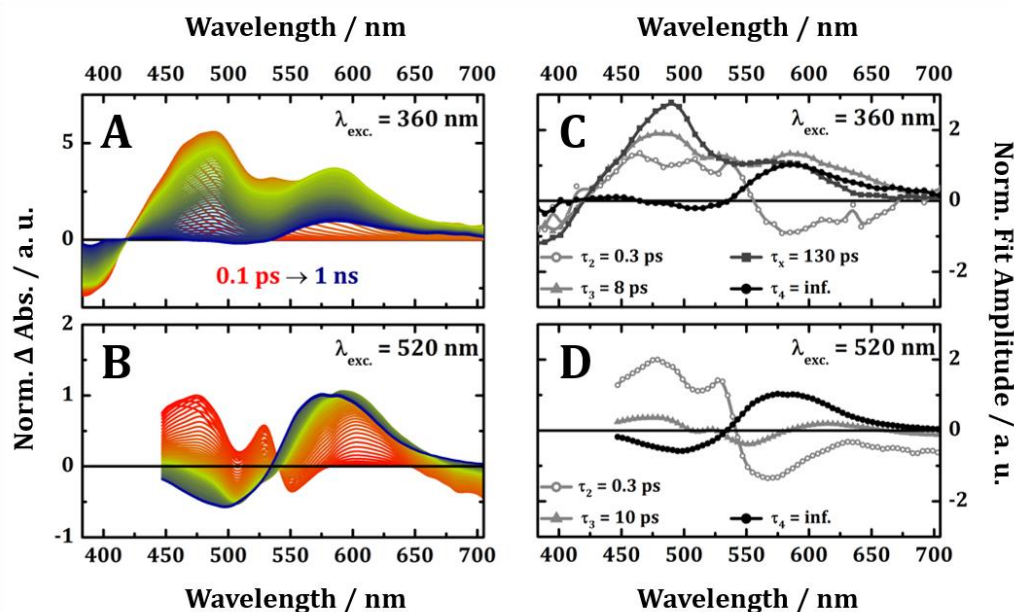


Abbildung 36: Zeitschnitte von GPR bei einem pH-Wert von 9 zu ausgewählten Verzögerungszeiten zwischen 0,1 ps und 1 ns nach einer Anregung bei 360 nm (A) und 520 nm (B). Amplitudenspektren der Zeitkonstanten nach der globalen Fit-Analyse von GPR bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 360 nm (C) und 520 nm (D).

Die Anpassung der Daten nach einer Anregung bei 360 nm erfordert die Verwendung einer zusätzlichen Zeitkonstante  $\tau_x$  von 130 ps. Das Amplitudenspektrum dieser Zeitkomponente besitzt eine große Amplitude im Bereich der beiden ESA-Banden bei 490 nm und 580 nm und des negativen Bleichsignals bei unter 400 nm. Das Spektrum der Zeitkonstante  $\tau_3$  zeigt eine ähnliche spektrale Signatur, was darauf hindeutet, dass  $\tau_x$  und  $\tau_3$  die gleichen Prozesse beschreiben. Im Endspektrum ( $\tau_4 = \infty$ ) sind zwei kleine negative Bleichbanden der Grundzustandsabsorption sowie die positive Bande des K-Photoprodukts zu erkennen. Außerdem zeigt das Spektrum ein kleines positives Signal bei etwa

445 nm, welches ausschließlich aus der Anregung der UV-absorbierenden Spezies resultiert.

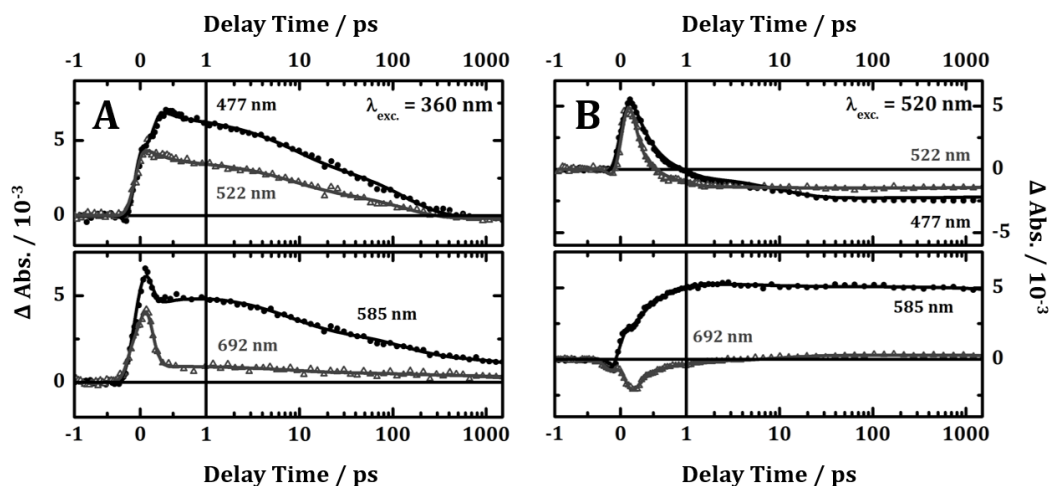


Abbildung 37: Einzeltransienten zu ausgewählten Wellenlängen von GPR bei einem pH-Wert von 9 nach einer Anregung bei 360 nm (A) und 520 nm (B). Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch dargestellt.

## 5.2.4 Diskussion

Das Ergebnis der pH-abhängigen Absorptionsmessungen an Proteorhodopsin zeigt die Bildung einer Absorptionsbande bei 365 nm mit steigendem pH-Wert, die bereits für den Wildtyp sowie die D227N-Mutante beschrieben ist. Diese Bande kann in Anlehnung an die Literatur dem Retinal mit deprotonierter Schiff-Base zugeordnet werden.[133,148,151] Obwohl das freie Retinal in Lösung ebenso eine Absorption in diesem Bereich zeigt, kann durch die Titration der Probe hin zu einem niedrigen pH-Wert, die mit einem Rückgang der UV-Bande verbunden ist, eine Degradation der Probe ausgeschlossen werden. Die wellenlängenabhängigen Fluoreszenzmessungen von Proteorhodopsin bei einem pH-Wert von 9 zeigen nach der UV-Anregung eine deutliche Fluoreszenzbande bei etwa 620 nm. Bei pH = 5 hingegen kann in diesem Spektralbereich nur eine sehr kleine Amplitude detektiert werden. Das Fluoreszenzmaximum liegt hier bei 730 nm, verursacht durch die  $S_0 \rightarrow S_2$ -Anregung des protonierten all-*trans*-Retinals.[150] Bei einem alkalischen pH-Wert wird die  $S_0 \rightarrow S_2$ -Absorption des protonierten Retinals durch die

Absorption des Retinals mit deprotonierter Schiff-Base überlagert. So führt die Anregung bei 365 nm zu einer Anregung der beiden Spezies und somit zur Bildung zweier Fluoreszenzbanden, was die Bestimmung der genauen Position der Fluoreszenzmaxima deutlich erschwert.

Die gleichzeitige Anregung der Retinale mit deprotonierter und protonierter Schiff-Base bei 360 nm bestimmt auch das transiente Spektrum von Proteorhodopsin in alkalischem Medium. Während bei einem pH-Wert von 5 nach einer  $S_0 \rightarrow S_2$ -Anregung und einer sehr schnellen „inneren Umwandlung“ (IC<sup>54</sup>) zu  $S_1$  eine Isomerisierung des Retinals mit protonierter Schiff-Base zum 13-*cis*-Isomer beobachtet wird, findet bei einem pH-Wert von 9 eine Überlagerung der Kinetiken der beiden Spezies statt. Die globale Fit-Analyse liefert fünf Zeitkonstanten, die anhand ihrer Amplitudenspektren sowie des Vergleichs mit den Messungen nach einer Anregung bei 520 nm den unterschiedlichen Protonierungsgraden der Schiff-Base zugeordnet werden können. Während die Zeitkonstante  $\tau_1$  innerhalb der Zeitauflösung des Experiments liegt und somit nicht ausreichend interpretiert werden kann, beschreibt die  $\tau_2$ -Komponente hauptsächlich den ESA-Zerfall der bei 520 nm absorbierenden Spezies und die Bildung des K-ähnlichen Photoprodukts. Die Zeitkonstante  $\tau_3$  liegt zwar in der gleichen Größenordnung wie die  $\tau_3$ -Zeit nach einer Anregung bei 520 nm (8 ps vs. 10 ps), ihre Amplitudenspektren unterscheiden sich jedoch sehr deutlich. Zusammen mit der zusätzlichen Zerfallszeit  $\tau_x$  beschreibt die  $\tau_3$ -Komponente nach UV-Anregung einen ungewöhnlich langsamen, biexponentiellen Zerfall des angeregten Zustandes mit 8 ps und 130 ps und kann demnach dem Retinal mit deprotonierter Schiff-Base zugeordnet werden. Die DAS der beiden Zeitkonstanten besitzen zwei Maxima bei 490 nm und 580 nm. Das Endspektrum nach 1.8 ns zeigt zwei GSB-Signale der beiden Spezies sowie die Absorption des K-ähnlichen Intermediats nach der all-*trans* zu 13-*cis* Isomerisierung des Retinals mit protonierter Schiff-Base. Eine ähnliche Primärdynamik mit vergleichbaren ESA-Zerfallszeiten und Absorptionsmaxima konnte bei dem UVA-Rezeptor des HKR1 (*histidine kinase*

---

<sup>54</sup> Internal Conversion (eng.)

*rhodopsin*) beobachtet werden.[152] Das Retinal mit deprotonierter Schiff-Base isomerisiert in HKR1 nach einer UV-Anregung von 13-*cis* zu all-*trans*. Es wird außerdem die Möglichkeit einer *anti/syn*-Isomerisierung der C(15)=N-Bindung aufgrund der langen S<sub>1</sub>-Lebensdauer vermutet. Wie in [148] beschrieben, kann ein deprotoniertes 13-*cis*-Retinal in PR nach einer Bestrahlung der Probe mit grünem Licht (520 nm) gebildet werden. Nach UV-Anregung findet anschließend die Protonierung der Schiff-Base statt. Dieser Prozess ist allerdings aufgrund mangelnder Möglichkeiten für Protonierungsreaktionen bei diesen Bedingungen sehr langsam ( $\tau_{1/2} = 30$  min für die D227N-Mutante). Außerdem liegt der Chromophor des Proteorhodopsins im dunkel-adaptierten Zustand ausschließlich in der all-*trans*-Konfiguration vor.[132] Somit kann die bei

360 nm absorbierende Spezies nur einem all-*trans*-Retinal mit deprotonierter Schiff-Base zugeordnet werden. So führt die UV-Anregung sehr wahrscheinlich zur Isomerisierung des Chromophors zu seiner 13-*cis*-Form während des beobachteten Zeitraums von 1,8 ns. Die fehlende Absorptionsbande des Photoprodukts sowie die kleine Amplitude des Bleichsignals bei <400 nm können dadurch erklärt werden, dass das ursprüngliche all-*trans*-Molekül und das Photoprodukt im ähnlichen Spektralbereich absorbieren und aus diesem Grund keine Absorptionsänderung detektiert werden kann. Außerdem ist es möglich, dass die Absorptionsbande des deprotonierten 13-*cis*-Retinals vom negativen GSB-Signal überlagert wird, was zu einer kleinen positiven Amplitude bei 445 nm am Ende der Messzeit führt. Eine Photoreaktion der bei 360 nm absorbierenden Spezies zu einem K-ähnlichen Photoprodukt würde eine Protonierung der Schiff-Base bedeuten und ist somit unwahrscheinlich.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in Proteorhodopsin bei einem pH-Wert von 9 ein gewisser Anteil der an das Lysin gebundenen Retinale deprotoniert in einer all-*trans*-Konformation vorliegt. Diese Spezies absorbiert bei 365 nm und besitzt ein im Vergleich zu den Retinalen mit protonierter Schiff-Base blauverschobenes Fluoreszenzspektrum. Die Primärdynamik lässt sich in einem einfachen Modell, das in Abbildung 38 dargestellt ist, zusammenfassen.

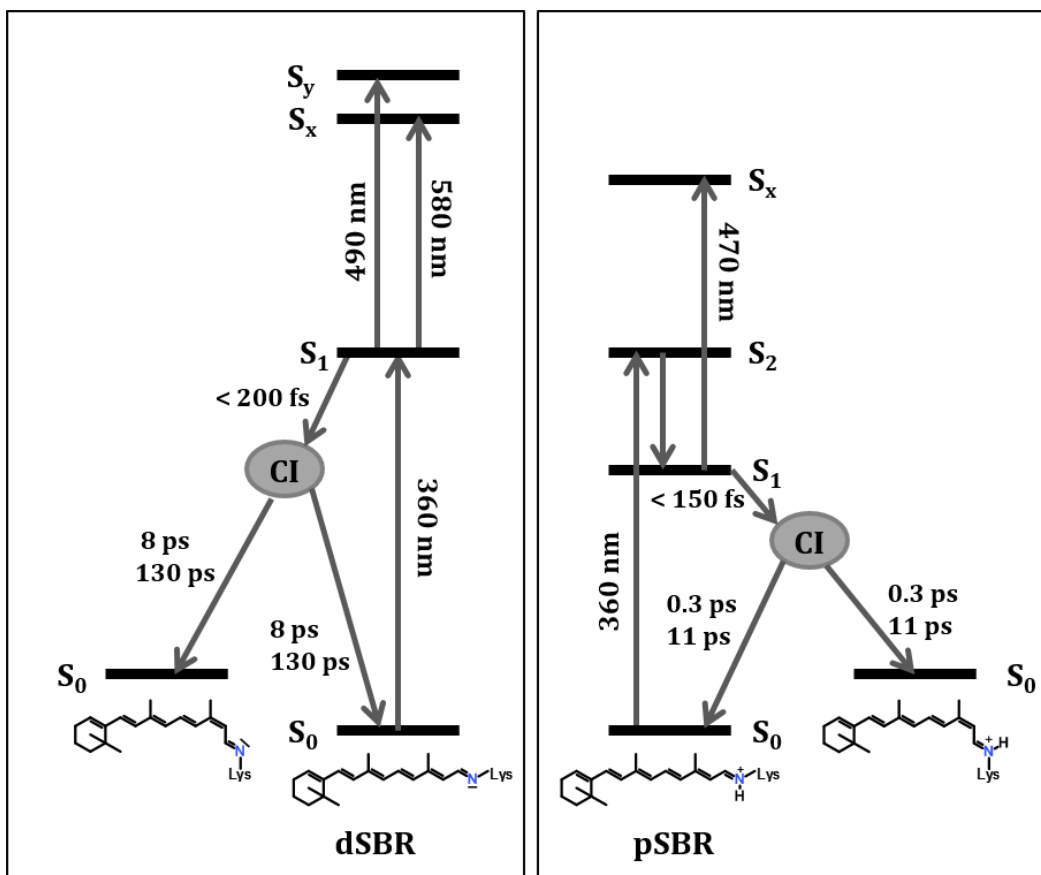


Abbildung 38: Reaktionsmodell der Isomerisierungsreaktion des Retinals mit deprotonierter (dSBR) und protonierter Schiff-Base (pSBR) des GPR nach einer Anregung bei 360 nm. CI: konische Durchschneidung.

Das all-*trans*-Retinal mit protonierter Schiff-Base, welches zu einem größeren Anteil vorliegt, wird von einem Laserpuls der Wellenlänge von 360 nm zuerst in den  $S_2$ -Zustand angeregt. Nach einem schnellen Übergang in den  $S_1$ -Zustand findet die bereits beschriebene Photoreaktion zum K-Photoprodukt statt.[116] Gleichzeitig findet eine  $S_0 \rightarrow S_1$ -Anregung des all-*trans*-Retinals mit deprotonierter Schiff-Base statt. Der angeregte Zustand zerfällt biexponentiell mit 8 ps und 130 ps, während sich das deprotonierte 13-*cis*-Photoprodukt bildet. Die anschließende Protonierung der Schiff-Base ist allerdings dadurch erschwert, dass das Asp-97 deprotoniert vorliegt. Somit endet diese Photoreaktion in einem für Proteorhodopsin üblichen Photozyklus.

## 6 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchungen der Reaktionsdynamik von Channelrhodopsin-2 (Kapitel 4) und grün-absorbierendem Proteorhodopsin (Kapitel 5) nach der Photoanregung des Chromophors unter Verwendung zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie in verschiedenen Zeit- und Spektralbereichen.

Mit Hilfe der Ultrakurzzeit-IR-Spektroskopie wurde zunächst die Proteinantwort auf die Retinalanregung im Spektralbereich der Carbonylschwingungen protonierter Aspartat- und Glutamat-Reste untersucht (Abschnitt 4.2). Es wurden dabei bereits nach einigen hundert Femtosekunden unter anderem Differenzbanden bei (+)1742/(-)1738  $\text{cm}^{-1}$  sowie (-)1709  $\text{cm}^{-1}$  detektiert, die anhand bisheriger Publikationen den Aminosäureresten D156 und E90 zugeordnet werden konnten. Aus der Tatsache, dass die aufgenommene spektrale Signatur nach sehr kurzen Verzögerungszeiten das FTIR-Spektrum des  $P_1$ -Intermediats ausreichend wiedergibt,[66,67,69] konnte geschlossen werden, dass die mit der Kanalöffnung einhergehenden Konformationsänderungen durch eine effektive Aufnahme der Überschussenergie durch das Protein auf einer sub-Pikosekunden-Zeitskala vorbereitet werden.

Des Weiteren wurden spektroskopische Untersuchungen an der R120H-Mutante des ChR-2 vorgestellt (Abschnitt 4.3). Da diese Mutante bei elektro-physiologischen Messungen keine Kanalaktivität zeigte, sollte zunächst geklärt werden, ob die Mutation einen Einfluss auf die Retinalisomerisierung und den nachfolgenden Photozyklus hat. Die Kurzzeit-Experimente im UV- und sichtbaren Spektralbereich zeigten bei der Mutante einen im Vergleich zum Wildtyp verlangsamten ESA-Zerfall sowie eine verzögerte Bildung des Photoprodukts; außerdem konnte kein zweites  $P_1$ -Intermediat im beobachteten Zeitraum detektiert werden. Insgesamt wurden deutliche Ähnlichkeiten der Primärreaktionsdynamiken zwischen dem Wildtyp bei einem pH-Wert von 4[102] und der R120H-Mutante festgestellt, was eine Auswirkung der

Punktmutation auf den pKs-Wert des primären Protonenakzeptors vermuten ließ. Im Gegensatz zur Primärreaktion konnten beim nachfolgenden Photozyklus der R120H-Mutante keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden. Daraus wurde gefolgert, dass die R120H-Mutante des ChR-2 einen intakten Protonenpumpmechanismus bei fehlender Kanalfunktion zeigt. Um die gestörte Kanalaktivität mit der Proteinantwort auf die Retinalanregung in Verbindung zu bringen, wurden anschließend Kurzzeit-IR-Messungen im Spektralbereich der Amid I-Bande sowie der Arginin-Schwingungen durchgeführt. So konnte das Signal bei  $1580\text{ cm}^{-1}$ , welches ausschließlich bei der Wildtyp-Probe detektiert wurde, einer Arginin-Seitenkette zugeordnet werden.[108] Der Hauptunterschied zwischen den Messungen an der R120H-Mutante und dem Wildtyp bestand allerdings in der Bildungsdynamik und der Intensität der Amid I-Bande. Während sich beim Wildtyp das negative Signal bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  mit einer Zeitkonstante von  $0,5\text{ ps}$  bildete und sich eine konstante Absorptionsänderung mit einer ungewöhnlich hohen Amplitude bis zum Ende der Messzeit zeigte,[69] konnte bei der Amid I-Bande der R120H-Mutante ein ganz anderer Verlauf beobachtet werden. Die Signalbildung erfolgte hier wesentlich langsamer ( $\tau = 3\text{ ps}$ ) als im Wildtyp und es konnte in den ersten  $100\text{ ps}$  eine durch Kühlprozesse verursachte Amplitudenabnahme beobachtet werden. So wurde bei der R120H-Mutante am Ende der Messzeit eine wesentlich kleinere Amplitude der Amid I-Bande als beim Wildtyp festgestellt, was auf einen signifikanten Einfluss der Punktmutation auf die Änderungen im Proteinrückgrat während der Retinalisomerisierung schließen ließ. Durch die Vergleichsmessungen an den Mutanten E123T und D253N konnte anschließend ein Zusammenhang zwischen der Amid I-Intensität und der Kanalaktivität hergestellt werden. Während bei der E123T-Mutante, die eine intakte Kanalfunktion zeigt,[96] der zeitliche Verlauf des Amid I-Signals von der Punktmutation unbeeinflusst blieb, konnte bei der inaktiven D253N-Mutante[65] keine Amid I-Bande detektiert werden. Diese Ergebnisse ließen somit die Schlussfolgerung zu, dass die Aminosäurereste R120 und D253 eine entscheidende Rolle beim schnellen Transfer der Überschussenergie an das

Protein nach der Retinalanregung und der so in Gang gesetzten Kanalöffnung spielen. Da R120 aufgrund seiner Orientierung nicht am Protonenpumpmechanismus teilnehmen kann,[78,89] konnte bei den Blitzlichtphotolyse-Messungen kein Einfluss dieser Punktmutation auf den Photozyklus festgestellt werden. Abschließend bleibt somit festzuhalten, dass sowohl die Kanalaktivität als auch der Protonenpumpmechanismus des ChR-2 zwar von der Retinalisomerisierung ausgelöst werden, letztendlich aber unabhängig voneinander ablaufen.

Im Abschnitt 4.4 wurde zusätzlich der Frage nachgegangen, inwieweit Veränderungen am Chromophor die Isomerisierungsreaktion, den nachfolgenden Photozyklus sowie die Funktion des ChR-2 als Ionenkanal beeinflussen können. Zu diesem Zweck wurden spektroskopische Untersuchungen an dem mit 9-12-Phenylretinal (PheRet) rekonstituierten ChR-2 vorgestellt. Das modifizierte Retinalanalogon zeigte im Vergleich zum *all-trans*-Retinal (ATR) in ChR-2 ein um etwa 50 nm hypsochrom verschobenes Absorptionsspektrum, was auf das veränderte  $\pi$ -Elektronensystem des Chromophors zurückzuführen ist. Außerdem konnte beim Absorptionsspektrum keine Schwingungsfeinstruktur beobachtet werden. Die Untersuchungen der Primärreaktion des PheRet in ChR-2 nach der Retinalanregung offenbarten ebenfalls signifikante Unterschiede zum nicht modifizierten Chromophor. Es konnte ein ungewöhnlich langlebiger angeregter Zustand und eine stark verzögerte Produktbildung beobachtet werden. Mit Hilfe einer zusätzlichen Simulation der Messergebnisse wurde ein Reaktionsmodell für die erste Photoreaktion aufgestellt. Nach diesem Modell findet während der ersten 200 fs nach der Anregung des Chromophors eine Wellenpaketsbewegung aus der Franck-Condon-Region auf der  $S_1$ -Potentialfläche statt. Aufgrund der gleichzeitigen Stokes-Verschiebung kommt es zu einer Überlagerung des ESA- und des SE-Signals, was zu zwei positiven Beiträgen im transienten Absorptionsspektrum führt. Die Relaxation entlang der  $S_1$ -Potentialfläche ( $\tau = 0,7$  ps) sowie die anschließenden Kühlprozesse ( $\tau = 4$  ps, 165 ps) verlaufen sehr langsam und mit dem Ergebnis, dass der Großteil der Moleküle in den



ursprünglichen *all-trans*-Grundzustand zurückkehrt. Die Tatsache, dass nur ein sehr kleiner Anteil zum 13-*cis*-Photoprodukt reagiert, konnte auf die veränderte Struktur des Chromophors und eine mögliche sterische Hinderung der Wasserstoffatome an C12 und C15 zurückgeführt werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Veränderungen am Retinal zu enormen Beeinträchtigungen des Photozyklus führen. Zum einen wurde ein sehr schneller Zerfall des ersten Photoprodukts sowie die Bildung eines zusätzlichen, blauverschobenen  $P_x$ -Zustands detektiert, während außerdem festgestellt wurde, dass nach Deprotonierung des isomerisierten PheRet der Großteil der modifizierten Retinale in den Ausgangszustand zurückkehrt und dass der  $P_3$ -Zustand nur in geringen Mengen gebildet wird. Die Messergebnisse führten somit zu der Schlussfolgerung, dass die *all-trans*-Konformation des PheRet in ChR-2 deutlich bevorzugt wird. Umso überraschender war das Ergebnis elektrophysiologischer Untersuchungen des Retinal-Analogons, die keine signifikanten Verminderungen der Photoströme im Vergleich zum ATR in ChR-2 zeigten. Somit sind die Veränderungen am Chromophor, die zu einer deutlichen Hemmung der Isomerisierungsreaktion führen und einen starken Einfluss auf den nachfolgenden Photozyklus haben, nicht ausreichend, um die Kanalaktivität von ChR-2 komplett zu blockieren, solange ein kleiner Anteil der Retinale isomerisieren kann.

Abschließend wurden im Abschnitt 5.2 spektroskopische Studien am *all-trans*-Retinal mit deprotonierter Schiff-Base im grün absorbierenden Proteorhodopsin (GPR) vorgestellt. Es konnte durch Titrationsexperimente gezeigt werden, dass diese UV-absorbierende Spezies in einem alkalischen Medium im Dunkelzustand akkumuliert werden kann und ein Absorptionsmaximum bei 365 nm sowie eine Fluoreszenzbande bei 620 nm aufweist. Die Untersuchungen der Primärreaktion mit Hilfe des *pump-probe*-Aufbaus im UV- und sichtbaren Spektralbereich zeigten beim Retinal mit deprotonierter Schiff-Base in GPR einen langsamen biexponentiellen Zerfall des angeregten Zustands mit anschließender Bildung des 13-*cis*-Photoprodukts. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein Reaktionsmodell für die ersten Prozesse

nach der UV-Anregung des Retinals im GPR aufgestellt werden, welches möglicherweise für weitere UV-Rezeptoren genutzt werden kann.



## 7 Literatur

- [1] M.A. van der Horst, K.J. Hellingwerf, Photoreceptor proteins, “star actors of modern times”: a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families, *Acc. Chem. Res.*, 37 (2004) 13–20.
- [2] K.P. Hofmann, P. Scheerer, P.W. Hildebrand, H.W. Choe, J.H. Park, M. Heck, O.P. Ernst, A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model, *Trends Biochem. Sci.*, 34 (2009) 540–552.
- [3] K.D. Ridge, N.G. Abdulaev, M. Sousa, K. Palczewski, Phototransduction: Crystal clear, *Trends Biochem. Sci.*, 28 (2003) 479–487.
- [4] K. Palczewski, G protein-coupled receptor rhodopsin, *Annu. Rev. Biochem.*, 75 (2006) 743–767.
- [5] E. Ritter, M. Elgeti, F.J. Bartl, Activity switches of Rhodopsin, *Photochem. Photobiol.*, 84 (2008) 911–920.
- [6] J.L. Spudich, C.S. Yang, K.H. Jung, E.N. Spudich, Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16 (2000) 365–392.
- [7] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, 233 (1971) 149–152.
- [8] J.K. Lanyi, Halorhodopsin - a second retinal pigment in *Halobacterium halobium*, *Trends Biochem. Sci.*, 6 (1981) 60–62.
- [9] A. Matsuno-Yagi, Y. Mukohata, Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78 (1977) 237–243.
- [10] O.P. Ernst, D.T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L.S. Brown, H. Kandori, Microbial and animal rhodopsins: Structures, functions, and molecular mechanisms, *Chem. Rev.*, 114 (2014) 126–163.
- [11] R.A. Spudich, John L. and Bogomolni, Mechanism of colour discrimination

- by a bacterial sensory rhodopsin, *Nature*, 312 (1984) 509–513.
- [12] D. Oesterhelt, The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8 (1998) 489–500.
- [13] J.K. Lanyi, Bacteriorhodopsin, *Annu. Rev. Physiol.*, 66 (2004) 665–688.
- [14] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, Functions of a new photoreceptor membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70 (1973) 2853–2857.
- [15] D.A. Bryant, N.U. Frigaard, Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated, *Trends Microbiol.*, 14 (2006) 488–496.
- [16] O. Béjà, L. Aravind, E. V. Koonin, M.T. Suzuki, A. Hadd, L.P. Nguyen, S.B. Jovanovich, C.M. Gates, R.A. Feldman, J.L. Spudich, E.N. Spudich, E.F. DeLong, Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea, *Science*, 289 (2000) 1902–1906.
- [17] O. Béjà, E.N. Spudich, J.L. Spudich, M. Leclerc, E.F. DeLong, Proteorhodopsin phototrophy in the ocean, *Nature*, 411 (2001) 786–789.
- [18] T. Friedrich, S. Geibel, R. Kalmbach, I. Chizhov, K. Ataka, J. Heberle, M. Engelhard, E. Bamberg, Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality, *J. Mol. Biol.*, 321 (2002) 821–838.
- [19] E. Lörinczi, M.-K. Verhoefen, J. Wachtveitl, A.C. Woerner, C. Glaubitz, M. Engelhard, E. Bamberg, T. Friedrich, Voltage- and pH-dependent changes in vectoriality of photocurrents mediated by wild-type and mutant proteorhodopsins upon expression in *Xenopus* oocytes, *J. Mol. Biol.*, 393 (2009) 320–341.
- [20] K.W. Foster, J. Saranak, N. Patel, G. Zarilli, M. Okabe, T. Kline, K. Nakanishi, A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*, *Nature*, 311 (1984) 756–759.
- [21] G. Nagel, T. Szellas, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Hegemann, E. Bamberg, Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels, *Biochem. Soc. Trans.*, 33 (2005) 863–866.
- [22] P. Hegemann, W. Gärtner, R. Uhl, All-trans retinal constitutes the functional chromophore in *Chlamydomonas* rhodopsin, *Biophys. J.*, 60

- (1991) 1477–1489.
- [23] P. Hegemann, Algal sensory photoreceptors, *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 59 (2008) 167–189.
- [24] O.A. Sineshchekov, K.-H. Jung, J.L. Spudich, Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (2002) 8689–8694.
- [25] G. Nagel, Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae, *Science*, 296 (2002) 2395–2398.
- [26] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (2003) 13940–13945.
- [27] E.S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, 8 (2005) 1263–1268.
- [28] A. Berndt, M. Prigge, D. Gradmann, P. Hegemann, Two open states with progressive proton selectivities in the branched channelrhodopsin-2 photocycle, *Biophys. J.*, 98 (2010) 753–761.
- [29] P. Hegemann, G. Nagel, From channelrhodopsins to optogenetics, *EMBO Mol. Med.*, 5 (2013) 173–176.
- [30] R.H. Kramer, D.L. Fortin, D. Trauner, New photochemical tools for controlling neuronal activity, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 19 (2009) 544–552.
- [31] G. Nagel, M. Brauner, J.F. Liewald, N. Adeishvili, E. Bamberg, A. Gottschalk, Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses, *Curr. Biol.*, 15 (2005) 2279–2284.
- [32] F. Zhang, L.-P. Wang, E.S. Boyden, K. Deisseroth, Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells, *Nat. Methods*, 3 (2006) 785–792.
- [33] F. Zhang, L.-P. Wang, M. Brauner, J.F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P.G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth, Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, *Nature*, 446 (2007) 633–639.

- 
- [34] H. Wang, J. Peca, M. Matsuzaki, K. Matsuzaki, J. Noguchi, L. Qiu, D. Wang, F. Zhang, E. Boyden, K. Deisseroth, H. Kasai, W.C. Hall, G. Feng, G.J. Augustine, High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104 (2007) 8143–8148.
- [35] P.W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley VCH, 2001.
- [36] C.N. Banwell, E.M. McCash, *Molekülspektroskopie: Ein Grundkurs*, R. Oldenbourg Verlag, 1999.
- [37] H. Haken, H.C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*, 5. Auflage, Springer Verlag, 2006.
- [38] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, 1995.
- [39] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Pre, 1983.
- [40] D. Meschede, *Optik, Licht und Laser*, 3. Auflage, Vieweg+Teubner, 2008.
- [41] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 5. Auflage, Wiley VCH, 1987.
- [42] D. Wolfgang, *Laserspektroskopie*, 5. Auflage, Springer Verlag, 2007.
- [43] W. Zinth, U. Zinth, *Optik: Lichtstrahlen-Wellen-Photonen*, 2. Auflage, Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 2009.
- [44] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1767 (2007) 1073–1101.
- [45] A. JABŁOŃSKI, Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes, *Nature*, 131 (1933) 839–840.
- [46] M. Kasha, Characterization of electronic transitions in complex molecules, *Discuss. Faraday Soc.*, 9 (1950) 14–19.
- [47] G. Cerullo, S. De Silvestri, Ultrafast optical parametric amplifiers, *Rev. Sci. Instrum.*, 74 (2003) 1–18.
- [48] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Spörlein, W. Zinth, Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR, *Appl. Phys. B*, 71 (2000) 457–465.

- [49] S. Chen, J. Wang, Self-starting issues of passive self-focusing mode locking, *Opt. Lett.*, 16 (1991) 1689–1691.
- [50] T. Brabec, C. Spielmann, P.F. Curley, F. Krausz, Kerr lens mode locking, *Opt. Lett.*, 17 (1992) 1292–1294.
- [51] E.P. Ippen, L.Y. Liu, H.A. Haus, Self-starting condition for additive-pulse mode-locked lasers, *Opt. Lett.*, 15 (1990) 183–185.
- [52] M.E. Fermann, M.L. Stock, M.J. Andrejco, Y. Silberberg, Passive mode locking by using nonlinear polarization evolution in a polarization-maintaining erbium-doped fiber, *Opt. Lett.*, 18 (1993) 894–896.
- [53] G. Vaillancourt, T.B. Norris, J.S. Coe, P. Bado, G.A. Mourou, Operation of a 1-kHz pulse-pumped Ti:sapphire regenerative amplifier, *Opt. Lett.*, 15 (1990) 317–319.
- [54] D. Strickland, G. Mourou, Compression of amplified chirped optical pulses, *Opt. Commun.*, 56 (1985) 219–221.
- [55] I. Kozma, P. Baum, S. Lochbrunner, E. Riedle, Widely tunable sub-30 fs ultraviolet pulses by chirped sum frequency mixing, *Opt. Express*, 11 (2003) 3110.
- [56] K. Neumann, Untersuchung ultraschneller Strukturdynamik photoschaltbarer Moleküle mittels Femtosekunden-Infrarotspektroskopie, Dissertation, (2010).
- [57] P. Hamm, S.M. Ohline, W. Zinth, Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene measured by femtosecond infrared spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, 106 (1997) 519–529.
- [58] P. Hamm, Coherent effects in femtosecond infrared spectroscopy, *Chem. Phys.*, 200 (1995) 415–429.
- [59] C. Slavov, H. Hartmann, J. Wachtveitl, Implementation and evaluation of data analysis strategies for time-resolved optical spectroscopy, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 2328–2336.
- [60] M.-K. Verhoefen, Funktionelle Dynamik des Retinalchromophors in verschiedenen Rhodopsinen, Dissertation, (2010).
- [61] P. Eberhardt, A Development of a spectrally resolved flash photolysis



- experiment and first measurements on microbial rhodopsins, Master Thesis, (2014).
- [62] S. Ehlenbeck, D. Gradmann, F. Braun, P. Hegemann, Evidence for a light-induced H<sup>+</sup> conductance in the eye of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.*, 82 (2002) 740–751.
- [63] R.D. Airan, K.R. Thompson, L.E. Fenno, H. Bernstein, K. Deisseroth, Temporally precise in vivo control of intracellular signalling, *Nature*, 458 (2009) 1025–1029.
- [64] J. Becker-Baldus, C. Bamann, K. Saxena, H. Gustmann, L.J. Brown, R.C.D. Brown, C. Reiter, E. Bamberg, J. Wachtveitl, H. Schwalbe, C. Glaubitz, Enlightening the photoactive site of channelrhodopsin-2 by DNP-enhanced solid-state NMR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112 (2015) 9896–9901.
- [65] V.A. Lórenz-Fonfría, T. Resler, N. Krause, M. Nack, M. Gossing, G. Fischer von Mollard, C. Bamann, E. Bamberg, R. Schlesinger, J. Heberle, Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to channel gating, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (2013) E1273-1281.
- [66] I. Radu, C. Bamann, M. Nack, G. Nagel, E. Bamberg, J. Heberle, Conformational changes of channelrhodopsin-2, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 7313–7319.
- [67] E. Ritter, K. Stehfest, A. Berndt, P. Hegemann, F.J. Bartl, Monitoring light-induced structural changes of channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 35033–35041.
- [68] M.-K. Verhoefen, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg, J. Wachtveitl, The photocycle of channelrhodopsin-2: ultrafast reaction dynamics and subsequent reaction steps, *ChemPhysChem*, 11 (2010) 3113–3122.
- [69] M.-K. Neumann-Verhoefen, K. Neumann, C. Bamann, I. Radu, J. Heberle, E. Bamberg, J. Wachtveitl, Ultrafast infrared spectroscopy on channelrhodopsin - 2 reveals efficient energy transfer from the retinal

- chromophore to the protein, *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013) 6968–6976.
- [70] C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, E. Bamberg, Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function, *J. Mol. Biol.*, 375 (2008) 686–694.
- [71] M. Nack, I. Radu, B.-J. Schultz, T. Resler, R. Schlesinger, A.-N. Bondar, C. del Val, S. Abbruzzetti, C. Viappiani, C. Bamann, E. Bamberg, J. Heberle, Kinetics of proton release and uptake by channelrhodopsin-2, *FEBS Lett.*, 586 (2012) 1344–1348.
- [72] K. Feldbauer, D. Zimmermann, V. Pintschovius, J. Spitz, C. Bamann, E. Bamberg, Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106 (2009) 12317–12322.
- [73] J.Y. Lin, M.Z. Lin, P. Steinbach, R.Y. Tsien, Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics, *Biophys. J.*, 96 (2009) 1803–1814.
- [74] O.P. Ernst, P.A. Sánchez Murcia, P. Daldrop, S.P. Tsunoda, S. Kateriya, P. Hegemann, Photoactivation of channelrhodopsin, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 1637–1643.
- [75] C. Bamann, R. Gueta, S. Kleinlogel, G. Nagel, E. Bamberg, Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond, *Biochemistry*, 49 (2010) 267–278.
- [76] K. Stehfest, E. Ritter, A. Berndt, F. Bartl, P. Hegemann, The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T, *J. Mol. Biol.*, 398 (2010) 690–702.
- [77] V.A. Lórenz-Fonfría, J. Heberle, Channelrhodopsin unchained: Structure and mechanism of a light-gated cation channel, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837 (2014) 626–642.
- [78] H.E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A.D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, O. Nureki, Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel, *Nature*, 482 (2012) 369–374.

- 
- [79] H.C. Watanabe, K. Welke, F. Schneider, S. Tsunoda, F. Zhang, K. Deisseroth, P. Hegemann, M. Elstner, Structural model of channelrhodopsin, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 7456–7466.
- [80] H.C. Watanabe, K. Welke, D.J. Sindhikara, P. Hegemann, M. Elstner, Towards an understanding of channelrhodopsin function: simulations lead to novel insights of the channel mechanism, *J. Mol. Biol.*, 425 (2013) 1795–1814.
- [81] A. Berndt, O. Yizhar, L.A. Gunaydin, P. Hegemann, K. Deisseroth, Bi-stable neural state switches, *Nat. Neurosci.*, 12 (2009) 229–234.
- [82] M. Kamiya, H.E. Kato, R. Ishitani, O. Nureki, S. Hayashi, Structural and spectral characterizations of C1C2 channelrhodopsin and its mutants by molecular simulations, *Chem. Phys. Lett.*, 556 (2013) 266–271.
- [83] M. Nack, I. Radu, M. Gossing, C. Bamann, E. Bamberg, G.F. von Mollard, J. Heberle, The DC gate in channelrhodopsin-2: crucial hydrogen bonding interaction between C128 and D156, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9 (2010) 194–198.
- [84] Y. Sugiyama, H. Wang, T. Hikima, M. Sato, J. Kuroda, T. Takahashi, T. Ishizuka, H. Yawo, Photocurrent attenuation by a single polar-to-nonpolar point mutation of channelrhodopsin-2, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8 (2009) 328–336.
- [85] K. Eisenhauer, J. Kuhne, E. Ritter, A. Berndt, S. Wolf, E. Freier, F. Bartl, P. Hegemann, K. Gerwert, In channelrhodopsin-2 Glu-90 is crucial for ion selectivity and is deprotonated during the photocycle, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 6904–6911.
- [86] K. Ruffert, B. Himmel, D. Lall, C. Bamann, E. Bamberg, H. Betz, V. Eulenburg, Glutamate residue 90 in the predicted transmembrane domain 2 is crucial for cation flux through channelrhodopsin 2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410 (2011) 737–743.
- [87] J. Wietek, J.S. Wiegert, N. Adeishvili, F. Schneider, H. Watanabe, S.P. Tsunoda, A. Vogt, M. Elstner, T.G. Oertner, P. Hegemann, Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel, *Science*, 344 (2014)

- 409–412.
- [88] A.P. Plazzo, N. De Franceschi, F. Da Broi, F. Zonta, M.F. Sanasi, F. Filippini, M. Mongillo, Bioinformatic and mutational analysis of channelrhodopsin-2 protein cation-conducting pathway, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 4818–25.
- [89] O. Volkov, K. Kovalev, V. Polovinkin, V. Borshchevskiy, C. Bamann, R. Astashkin, E. Marin, A. Popov, T. Balandin, D. Willbold, G. Büldt, E. Bamberg, V. Gordeliy, Structural insights into ion conduction by channelrhodopsin 2, *Science* (80-. ), 358 (2017) eaan8862.
- [90] E. Kölling, W. Gärtner, D. Oesterhelt, L. Ernst, Sterically fixed retinal-analogue prevents proton-pumping activity in bacteriorhodopsin, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 23 (1984) 81–82.
- [91] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J.-M. Ruyschaert, Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy, *Physicochem. Methods Study Biomembr.*, (1994) 405–450.
- [92] R. Diller, S. Maiti, G.C. Walker, B.R. Cowea, R. Pippenger, R.A. Bogomolni, R.M. Hochstrasser, Femtosecond time-resolved infrared laser study of the J-K transition of bacteriorhodopsin, *Chem. Phys. Lett.*, 241 (1995) 109–115.
- [93] K. Neumann, M.-K. Verhoefen, I. Weber, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, Initial reaction dynamics of proteorhodopsin observed by femtosecond infrared and visible spectroscopy, *Biophys. J.*, 94 (2008) 4796–4807.
- [94] J. Kuhne, K. Eisenhauer, E. Ritter, P. Hegemann, K. Gerwert, F. Bartl, Early formation of the ion-conducting pore in channelrhodopsin-2, *Angew. Chemie (International Ed.)*, 54 (2015) 4953–4957.
- [95] T. Resler, B.-J. Schultz, V.A. Lórenz-Fonfría, R. Schlesinger, J. Heberle, Kinetic and vibrational isotope effects of proton transfer reactions in channelrhodopsin-2, *Biophys. J.*, 109 (2015) 287–297.
- [96] V.A. Lórenz-Fonfría, B.-J. Schultz, T. Resler, R. Schlesinger, C. Bamann, E. Bamberg, J. Heberle, Pre-gating conformational changes in the ChETA variant of channelrhodopsin-2 monitored by nanosecond IR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 137 (2015) 1850–1861.

- 
- [97] B. Nie, J. Stutzman, A. Xie, A vibrational spectral marker for probing the hydrogen-bonding status of protonated Asp and Glu residues, *Biophys. J.*, 88 (2005) 2833–2847.
- [98] Y. Furutani, A. Kawanabe, K.-H. Jung, H. Kandori, FTIR spectroscopy of the all-trans form of Anabaena sensory rhodopsin at 77 K: hydrogen bond of a water between the Schiff base and Asp75, *Biochemistry*, 44 (2005) 12287–12296.
- [99] M.S. Braiman, T. Mogi, T. Marti, L.J. Stern, H.G. Khorana, K.J. Rothschild, Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212, *Biochemistry*, 27 (1988) 8516–8520.
- [100] K.J. Rothschild, O. Bousché, M.S. Braiman, C.A. Hasselbacher, J.L. Spudich, Fourier transform infrared study of the halorhodopsin chloride pump, *Biochemistry*, 27 (1988) 2420–2424.
- [101] R. Diller, M. Iannone, B.R. Cowen, S. Maiti, R.A. Bogomolni, R.M. Hochstrasser, Picosecond dynamics of bacteriorhodopsin, probed by time-resolved infrared spectroscopy, *Biochemistry*, 31 (1992) 5567–5572.
- [102] F. Scholz, E. Bamberg, C. Bamann, J. Wachtveitl, Tuning the primary reaction of channelrhodopsin-2 by imidazole, pH, and site-specific mutations, *Biophys. J.*, 102 (2012) 2649–2657.
- [103] K. Wynne, R.M. Hochstrasser, The theory of ultrafast vibrational spectroscopy, *Chem. Phys.*, 193 (1995) 211–236.
- [104] K. Ekvall, P. van der Meulen, C. Dhollande, L.-E. Berg, S. Pommeret, R. Naskrecki, J.-C. Mialocq, Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy, *J. Appl. Phys.*, 87 (2000) 2340–2352.
- [105] L. Song, M. a El-Sayed, J.K. Lanyi, Protein catalysis of the retinal subpicosecond photoisomerization in the primary process of bacteriorhodopsin photosynthesis, *Science*, 261 (1993) 891–894.
- [106] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten, Structural changes during the formation of early intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle,

- Biophys. J., 83 (2002) 1281–1297.
- [107] L.A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V.S. Sohal, K. Deisseroth, P. Hegemann, Ultrafast optogenetic control, *Nat. Neurosci.*, 13 (2010) 387–392.
- [108] T. Resler, Time-resolved analysis of protonation dynamics in channelrhodopsin-2, Dissertation, (2016).
- [109] D.Y. Vorobyev, C.H. Kuo, D.G. Kuroda, J.N. Scott, J.M. Vanderkooi, R.M. Hochstrasser, Water-induced relaxation of a degenerate vibration of Guanidium using 2D IR echo spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 2944–2953.
- [110] J.K. Delaney, G.H. Atkinson, M. Sheves, M. Ottolenghi, Picosecond time-resolved absorption dynamics in the artificial bacteriorhodopsin pigment BR69, *J. Phys. Chem.*, 99 (1995) 7801–7805.
- [111] R. Gross, C. Schumann, M.M.N. Wolf, J. Herbst, R. Diller, N. Friedman, M. Sheves, Ultrafast protein conformational alterations in bacteriorhodopsin and its locked analogue BR512, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 7851–7860.
- [112] M. Wanko, M. Hoffmann, T. Frauenheim, M. Elstner, Computational photochemistry of retinal proteins, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 20 (2006) 511–518.
- [113] G.G. Kochendoerfer, S.W. Lin, T.P. Sakmar, R.A. Mathies, How color visual pigments are tuned, *Trends Biochem. Sci.*, 24 (1999) 300–305.
- [114] M.A. El-sayed, B. Karvaly, J.M. Fukumoto, Primary step in the bacteriorhodopsin photocycle: Photochemistry or excitation transfer?, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78 (1981) 7512–7516.
- [115] T. Takahashi, B. Yan, P. Mazur, F. Derguini, K. Nakanishi, J.L. Spudich, Color regulation in the archaebacterial phototaxis receptor phoborhodopsin (sensory rhodopsin II), *Biochemistry*, 29 (1990) 8467–8474.
- [116] M.O. Lenz, R. Huber, B. Schmidt, P. Gilch, R. Kalmbach, M. Engelhard, J. Wachtveitl, First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin, *Biophys. J.*, 91 (2006) 255–262.
- [117] B. Schmidt, C. Sobotta, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, P. Gilch, Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond

- fluorescence spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1706 (2005) 165–73.
- [118] J.K. Lanyi, B. Schobert, Mechanism of proton transport in bacteriorhodopsin from crystallographic structures of the K, L, M1, M2, and M2' intermediates of the photocycle, *J. Mol. Biol.*, 328 (2003) 439–450.
- [119] J.K. Lanyi, B. Schobert, Structural changes in the L photointermediate of bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.*, 365 (2007) 1379–1392.
- [120] D.B. Rusch, A.L. Halpern, G. Sutton, K.B. Heidelberg, S. Williamson, S. Yooseph, D. Wu, J.A. Eisen, J.M. Hoffman, K. Remington, K. Beeson, B. Tran, H. Smith, H. Baden-Tillson, C. Stewart, J. Thorpe, J. Freeman, C. Andrews-Pfannkoch, J.E. Venter, K. Li, et al., The sorcerer II global ocean sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific, *PLoS Biol.*, 5 (2007) 0398–0431.
- [121] G. Sabehi, R. Massana, J.P. Bielawski, M. Rosenberg, E.F. Delong, O. Béjà, Novel proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas, *Environ. Microbiol.*, 5 (2003) 842–849.
- [122] J.C. Venter, K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H. Knap, M.W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, et al., Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea, *Science*, 304 (2004) 66–74.
- [123] J.R. de la Torre, L.M. Christianson, O. Béjà, M.T. Suzuki, D.M. Karl, J. Heidelberg, E.F. DeLong, Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (2003) 12830–12835.
- [124] J.M. Walter, D. Greenfield, C. Bustamante, J. Liphardt, Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104 (2007) 2408–2412.
- [125] A. Martinez, A.S. Bradley, J.R. Waldbauer, R.E. Summons, E.F. DeLong, Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*,

- 104 (2007) 5590–5595.
- [126] W.W. Wang, O.A. Sineshchekov, E.N. Spudich, J.L. Spudich, Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 33985–33991.
- [127] D. Man, W. Wang, G. Sabehi, L. Aravind, A.F. Post, R. Massana, E.N. Spudich, J.L. Spudich, O. Bèjà, Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins, *EMBO J.*, 22 (2003) 1725–1731.
- [128] J. Mao, N.-N. Do, F. Scholz, L. Reggie, M. Mehler, A. Lakatos, Y.-S. Ong, S.J. Ullrich, L.J. Brown, R.C.D. Brown, J. Becker-Baldus, J. Wachtveitl, C. Glaubitz, Structural basis of the green-blue color switching in proteorhodopsin as determined by NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 136 (2014) 17578–17590.
- [129] J.M. Kralj, E.N. Spudich, J.L. Spudich, K.J. Rothschild, Raman spectroscopy reveals direct chromophore interactions in the Leu/Gln105 spectral tuning switch of proteorhodopsins, *J. Phys. Chem. B*, 112 (2008) 11770–11776.
- [130] T. Ran, G. Ozorowski, Y. Gao, O.A. Sineshchekov, W. Wang, J.L. Spudich, H. Luecke, Cross-protomer interaction with the photoactive site in oligomeric proteorhodopsin complexes, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 69 (2013) 1965–1980.
- [131] S. Reckel, D. Gottstein, J. Stehle, F. Löhr, M.-K. Verhoefen, M. Takeda, R. Silvers, M. Kainosho, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, F. Bernhard, H. Schwalbe, P. Güntert, V. Dötsch, Solution NMR structure of proteorhodopsin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 50 (2011) 11942–11946.
- [132] N. Pflieger, M. Lorch, A.C. Woerner, S. Shastri, C. Glaubitz, Characterisation of Schiff base and chromophore in green proteorhodopsin by solid-state NMR, *J. Biomol. NMR*, 40 (2008) 15–21.
- [133] E.S. Imasheva, S.P. Balashov, J.M. Wang, A.K. Dioumaev, J.K. Lanyi, Selectivity of retinal photoisomerization in proteorhodopsin is controlled by aspartic acid 227, *Biochemistry*, 43 (2004) 1648–1655.
- [134] A.K. Dioumaev, L.S. Brown, J. Shih, E.N. Spudich, J.L. Spudich, J.K. Lanyi,



- Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin, *Biochemistry*, 41 (2002) 5348–5358.
- [135] S.P. Balashov, L.E. Petrovskaya, E.P. Lukashev, E.S. Imasheva, A.K. Dioumaev, J.M. Wang, S. V. Sychev, D.A. Dolgikh, A.B. Rubin, M.P. Kirpichnikov, J.K. Lanyi, Aspartate-histidine interaction in the retinal schiff base counterion of the light-driven proton pump of *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochemistry*, 51 (2012) 5748–5762.
- [136] F. Hempelmann, S. Hölper, M.-K. Verhoefen, A.C. Woerner, T. Köhler, S.-A. Fiedler, N. Pflieger, J. Wachtveitl, C. Glaubitz, His75-Asp97 cluster in green proteorhodopsin, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 4645–4654.
- [137] A.K. Dioumaev, J.M. Wang, Z. Bálint, G. Váró, J.K. Lanyi, Proton transport by proteorhodopsin requires that the retinal Schiff base counterion Asp-97 be anionic, *Biochemistry*, 42 (2003) 6582–6587.
- [138] M.-K. Verhoefen, G. Schäfer, S. Shastri, I. Weber, C. Glaubitz, W. Mäntele, J. Wachtveitl, Low temperature FTIR spectroscopy provides new insights in the pH-dependent proton pathway of proteorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807 (2011) 1583–1590.
- [139] R. Huber, T. Köhler, M.O. Lenz, E. Bamberg, R. Kalmbach, M. Engelhard, J. Wachtveitl, pH-dependent photoisomerization of retinal in proteorhodopsin, *Biochemistry*, 44 (2005) 1800–1806.
- [140] M.O. Lenz, A.C. Woerner, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, Photoisomerization in proteorhodopsin mutant D97N, *Photochem. Photobiol.*, 83 (2007) 226–231.
- [141] M. Mehler, F. Scholz, S.J. Ullrich, J. Mao, M. Braun, L.J. Brown, R.C.D. Brown, S. a Fiedler, J. Becker-Baldus, J. Wachtveitl, C. Glaubitz, The EF loop in green proteorhodopsin affects conformation and photocycle dynamics, *Biophys. J.*, 105 (2013) 385–397.
- [142] M. Lakatos, J.K. Lanyi, J. Szakács, G. Váró, The photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low pH, *Biophys. J.*, 84 (2003) 3252–3256.
- [143] M. Lakatos, G. Váró, The influence of water on the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low and high pH, *J. Photochem. Photobiol. B.*,

- 73 (2004) 177–182.
- [144] K. Yamada, A. Kawanabe, H. Kandori, Importance of alanine at position 178 in proteorhodopsin for absorption of prevalent ambient light in the marine environment, *Biochemistry*, 49 (2010) 2416–2423.
- [145] M. Yoshitsugu, M. Shibata, D. Ikeda, Y. Furutani, H. Kandori, Color change of proteorhodopsin by a single amino acid replacement at a distant cytoplasmic loop, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 47 (2008) 3923–3926.
- [146] M. Yoshitsugu, J. Yamada, H. Kandori, Color-changing mutation in the E-F loop of proteorhodopsin, *Biochemistry*, 48 (2009) 4324–4330.
- [147] C. Bamann, E. Bamberg, J. Wachtveitl, C. Glaubitz, *Proteorhodopsin*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837 (2014) 614–625.
- [148] E.S. Imasheva, K. Shimono, S.P. Balashov, J.M. Wang, U. Zadok, M. Sheves, N. Kamo, J.K. Lanyi, Formation of a long-lived photoproduct with a deprotonated Schiff base in proteorhodopsin, and its enhancement by mutation of Asp227, *Biochemistry*, 44 (2005) 10828–10838.
- [149] E. Bühl, M. Braun, A. Lakatos, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, Fluorescence and excited state dynamics of the deprotonated Schiff base retinal in proteorhodopsin, *Biol. Chem.*, 369 (2015) 1109–1115.
- [150] I. Nielsen, L. Lammich, L. Andersen, S1 and S2 excited states of gas-phase Schiff-base retinal chromophores, *Phys. Rev. Lett.*, 96 (2006) 018304 1-4.
- [151] J. Herz, M.-K. Verhoefen, I. Weber, C. Bamann, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, Critical role of Asp227 in the photocycle of proteorhodopsin, *Biochemistry*, 51 (2012) 5589–5600.
- [152] M. Luck, T. Mathes, S. Bruun, R. Fudim, R. Hagedorn, T.M. Tran Nguyen, S. Kateriya, J.T.M. Kennis, P. Hildebrandt, P. Hegemann, A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 40083–40090.



## 8 Anhang

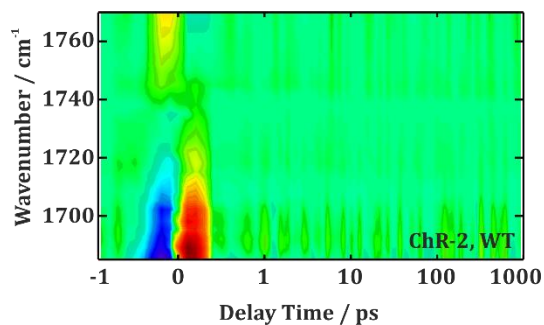


Abbildung A 1: Transiente Absorptionsänderungen von ChR-2 im Bereich der Carbonylschwingungen der protonierten Aspartat- und Glutamat-Reste zwischen 1687 cm<sup>-1</sup> und 1770 cm<sup>-1</sup>. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch dargestellt.

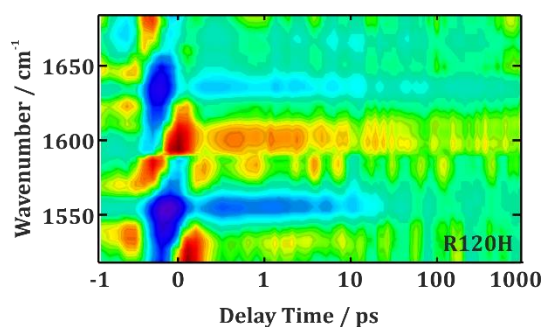


Abbildung A 2: Transiente Absorptionsänderungen der R120H-Mutante von ChR-2 zwischen 1500 cm<sup>-1</sup> und 1684 cm<sup>-1</sup>. Die Abbildung ist aus zwei nacheinander aufgenommenen Messungen zusammengesetzt.

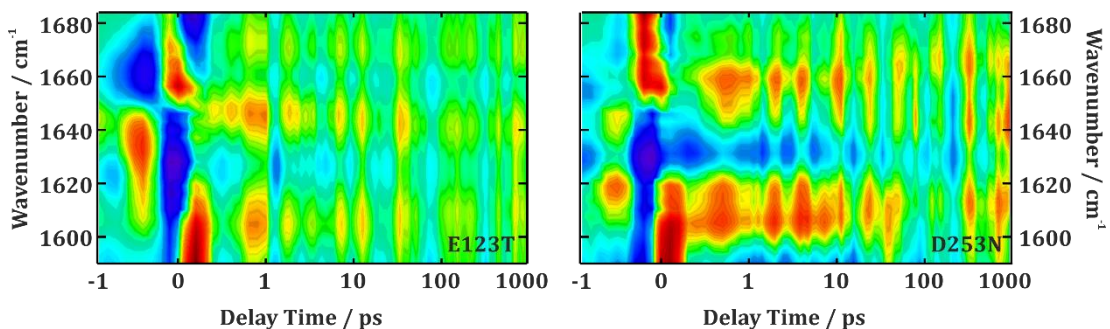


Abbildung A 3: Transiente Absorptionsänderungen der Mutante E123T (links) und D253N (rechts) von ChR-2 zwischen 1590 cm<sup>-1</sup> und 1684 cm<sup>-1</sup>. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und danach logarithmisch dargestellt.



## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren begleitet und unterstützt haben.

Ich danke meinem Doktorvater **Prof. Dr. Josef Wachtveitl** für die Möglichkeit, in seiner Gruppe zu arbeiten und zu forschen, und für die Vergabe des spannenden Themas für meine Dissertation. Durch das mir entgegengebrachte Vertrauen und die nötigen Freiheiten bei der Umsetzung meiner Ideen habe ich in den letzten Jahren eine tolle Betreuung und Unterstützung erfahren. Nicht zuletzt habe ich seine herzliche Art und die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe jederzeit sehr geschätzt.

Ein großes Dankeschön gilt **Dr. Markus Braun** für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft, sein offenbar grenzenloses Wissen und die spannenden Diskussionen, bei denen ich immer etwas lernen und mit auf den Weg nehmen konnte. Ebenfalls bedanke ich mich für die geradlinige und gleichzeitig entgegenkommende Leitung des PC-Praktikums sowie das Korrekturlesen der Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Kooperationspartnern **Prof. Dr. Clemens Glaubitz, Dr. Andrea Lakatos, Prof. Dr. Ernst Bamberg, Dr. Christian Bamann, Prof. Dr. Joachim Heberle, Dr. Tom Resler, Prof. Dr. Andreas Dreuw** und **Dr. Jan-Michael Mewes** für die erfolgreiche Zusammenarbeit an zahlreichen Projekten und die Bereitstellung der Proben.

Meinen Mentoren **Dr. Markus Braun** und **Prof. Dr. Alexander Heckel** danke ich für ihre Zeit und Unterstützung bei der Planung meiner Forschungsarbeit.

Vielen Dank an **Dr. Mirka-Kristin Neumann-Verhoefen** für die für mich persönlich sehr wichtige Betreuung in der Anfangsphase meiner Promotion.

Ich danke **Dr. Andreas Reuss** für seine bedingungslose Hilfsbereitschaft, die vielen konstruktiven Gespräche und seine Freundschaft.

Meiner langjährigen Büronachbarin **Dr. Sabrina Wahl** danke ich für die angenehme und oft sehr humorvolle Atmosphäre im „Mädelsbüro“, ihre

Hilfestellungen, die vielen Gespräche (nicht nur über die Wissenschaft) und das Ertragen meiner oft zu lauten und möglicherweise monotonen Musik. Ich danke auch meinen neuen Büronachbarinnen **Lisa-Marie Herzig** und **Sina Roth** für ein angenehmes Büroklima und ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ebenfalls danke ich **Peter Eberhardt** für tolle Zusammenarbeit bei vielen Retinal-Projekten, für konstruktive und oft einfach lustige Gespräche, für seine Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Computerkatastrophen und das nette und freundschaftliche Verhältnis.

Ich bedanke mich bei unserer „alten“ Gruppe, bei **Sabrina, Andreas, Peter T., Jörg, Heike** und **Frank**, für eine tolle Zeit mit vielen schönen Momenten. Vielen Dank auch an **Lisa, Sina, Felix, Chavdar, Elias, Henrik, Kris, Dinh, Chahinez, Lars, Chris, Peter, Chokri, David** und **Marvin** für ein tolles Arbeitsklima, unterhaltsame Kaffeepausen, spannende Ausflüge und ihre Hilfsbereitschaft.

Danke an **Kirstin Grönitz, Angelika Koppka** und **Isolde Torabi** für ihre großartige Arbeit und ihr Engagement in der und für die Gruppe.

Auch bedanke ich mich bei all meinen **Lehrern** und **Dozenten**, die mir Vieles mit auf den Weg gegeben haben, mich ausgebildet und auch mitgeprägt haben.

Ich danke allen meinen **Freunden** und meiner tollen großen **Familie**, die mich immer unterstützt haben und immer für mich da waren.

Ganz besonders danke ich meinen **Eltern** für alles, was ich habe und was ich bin. Ich kann mich glücklich schätzen, euch als Eltern zu haben.

Ich bedanke mich auch bei meinen **Schwiegereltern** dafür, dass ich dort mein zweites Zuhause gefunden habe.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen zwei Jungs, für die ich gerne nach Hause komme und die mich einfach glücklich machen. Ich bin sehr froh, dass es euch gibt!

# Eidesstattliche Erklärung

Ich, Elena Bühl, erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen zur Aufklärung der Photoreaktionen mikrobieller Rhodopsine“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe. Alle Entlehnungen aus anderen Schriften sind mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen und habe diese Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Frankfurt, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift





# Publikationen und Konferenzbeiträge

## Eigene Publikationen

E. Bühl, M. Braun, A. Lakatos, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, Fluorescence and excited state dynamics of the deprotonated Schiff base retinal in proteorhodopsin, *Biol. Chem.*, 196 (2015) 1109-1115.

J.M. Mewes, E. Pepler, J. Wachtveitl, A. Dreuw, Combined theoretical and experimental investigations of the photodecarboxylation of nitrophenylacetates and its implications for the design of improved ortho-nitrobenzylic caging groups, *J. Phys. Chem. A*, 116 (2012) 11846-11862.

## Publikationen in Vorbereitung

E. Bühl, P. Eberhardt, E. Bamberg, C. Bamann, J. Wachtveitl, Ultrafast protein response in channelrhodopsin-2 studied by time-resolved IR spectroscopy, in preparation.

T. Resler, E. Bühl, C. Bamann, R. Lam, R. Schlesinger, B. Schulz, E. Bamberg, J. Wachtveitl, J. Heberle, Assessing the role of R120 in the gating of ChR2 by time-resolved IR spectroscopy from femto- to milliseconds, in preparation.

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

## Konferenzbeiträge

*Ultrafast reaction dynamics of channelrhodopsin-2*, Conference on time-resolved vibrational spectroscopy, TRVS, 2015, Madison, WI, USA (Poster).

*Reaction dynamics of channelrhodopsin-2*, Colloquium CRC 807, 2015, Frankfurt am Main, Germany (Vortrag).

*Ultrafast reaction dynamics of Proteorhodopsin and channelrhodopsin-2*, Annual seminar of the Institute of Physical and Theoretical Chemistry, 2015, Hirschegg, Austria (Vortrag).

*Wavelength dependent primary reaction of green proteorhodopsin*, 16<sup>th</sup> International conference on retinal proteins, ICRP, 2014, Nagahama, Japan (Poster).

*Aspects of colour tuning and wavelength dependent primary reaction of GPR*, Membrane transport and communications, CRC 807 international symposium, 2014, Frankfurt am Main, Germany (Poster).

*Primary reaction of ChR-2 mutant R120H*, CRC 807 retreat, 2013, Obergurgl, Austria (Vortrag).

*The photo-induced decarboxylation of nitrophenyl acetates*, Annual seminar of the Institute of Physical and Theoretical Chemistry, 2012, Hirschegg, Austria (Vortrag).

*The photo-induced decarboxylation of nitrophenyl acetates*, The Madrid conference on femtochemistry, FEMTO 10, 2011, Madrid, Spain (Poster).