



Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 2: Biologische Strukturforschung

***Zeitauflösende
Schwingungsspektroskopie an
Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin***

Carsten Bolwien

***Zeitauflösende
Schwingungsspektroskopie an
Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin***

Carsten Bolwien

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3945
ISSN 0944-2952
Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 2: Biologische Strukturforschung Jül-3945
D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zeitauflösende Schwingungsspektroskopie an Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin

Die Proteine Bacteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) finden sich in der Zellmembran des salzliebenden Archaeobakteriums *Halobacterium salinarum*. BR ermöglicht unter extremen Bedingungen als *lichtgetriebene* Protonenpumpe einen zur Atmungskette alternativen Weg der Herstellung eines Protonengradienten. HR dient als lichtgetriebene Chloridpumpe der Aufrechterhaltung der Salzkonzentration im Inneren der Zelle bei wechselnden Bedingungen. Die von beiden Proteinen bekannten Röntgenstrukturen — im Fall von BR sind darüber hinaus Strukturen einiger Photozyklusintermediate bekannt — bilden eine wichtige Grundlage zum Verständnis des jeweiligen Funktionsmechanismus. Sie können aber die Dynamik der Prozesse während des Photozyklus nicht abbilden. Diese Lücke schließt die zeitauflösende Schwingungsspektroskopie, die in der Lage ist, transiente Änderungen in der Struktur der Proteine zu detektieren.

Die Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie an BR mit *polarisiertem* Messlicht liefert mit dem zeitaufgelösten Lineardichroismus einen zusätzlichen Parameter zur Beschreibung der Strukturänderungen während des Photozyklus. Lineardichroismus-Messungen werden einerseits zu einer verbesserten Auftrennung der Intermediatspektren genutzt, andererseits ermöglichen sie die Bestimmung der Orientierung von Übergangsdipolmomenten bzw. zugeordneter Bindungsstrukturen. Darüber hinaus können in Röntgenstrukturen nicht sichtbare transiente Protonierungen von Aminosäureseitenketten, die bei einer Protonenpumpe einen entscheidenden Teil des Funktionsmechanismus ausmachen, auf diese Weise verfolgt werden.

Im Vergleich zu BR ist über den Photozyklus der Chloridpumpe Halorhodopsin deutlich weniger bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss der Chloridkonzentration auf die Kinetik mittels zeitauflösender FTIR-Spektroskopie untersucht. Die Verwendung der *attenuated total reflection* (ATR)-Technik, hier mit einer neuartigen Diamant-ATR-Zelle, ermöglicht die reproduzierbare Einstellung von Salzkonzentrationen bei Infrarotmessungen von 0 bis 5 mol/l. Der entsprechende Einfluss auf die Entstehung und den Zerfall von Intermediaten erlaubt die Formulierung eines alternativen Photozyklusmodells.

Resonanz-Raman-Messungen an beiden Proteinen liefern ergänzende Informationen zur Zuordnung der Schwingungsbanden und demonstrieren die Möglichkeiten der Apparatur als Mikro-Raman-Spektrometer bei der Untersuchung von Proteinkristallen.

Time-resolving vibrational spectroscopy on Bacteriorhodopsin and Halorhodopsin

The proteins Bacteriorhodopsin (BR) and Halorhodopsin (HR) can be found in the cell membrane of the halophilic archaebacterium *Halobacterium salinarum*. Under extreme circumstances, BR as a light-driven proton pump provides an alternative to the respiratory chain in order to establish a proton gradient. HR as a light-driven chloride pump is used to maintain the chloride concentration in the cytoplasm under varying conditions. The previously published ground state x-ray structures of both proteins—in the case of BR additional structures of photocycle intermediates are known—form an important basis for the understanding of the functional mechanism, although they fail to provide a dynamic picture of the process. However, this picture is provided by time-resolving vibrational spectroscopy, which is able to detect transient changes in the structure of the proteins.

Fourier-Transform Infrared (FTIR)-spectroscopy on BR with *polarized* measuring light presents an additional parameter, the linear dichroism, to track the structural changes during the photocycle. These measurements are used not only for improved separation of the photocycle intermediates, but also to calculate orientations of transition dipole moments and thereby of structural elements. In addition, it is possible to resolve transient protonations of amino acid side chains, an important part of the mechanism of a proton pump and also invisible with the x-ray technique.

In contrast to BR not much is known about the photocycle of the chloride pump HR. In this work, the influence of the chloride concentration on the kinetics is investigated with time-resolving FTIR-spectroscopy. The use of the *attenuated total reflection* ATR-technique, here with a new diamond ATR cell, allows reproducible adjustment of the salt concentration in infrared experiments in the range between 0 to 5 mol/L. An alternative photocycle model has been formulated based on the respective influence on the formation and decay of the intermediates.

Resonance Raman measurements on both proteins give additional information on the assignment of vibrational modes and demonstrate the potential of the spectroscopic setup as a micro-Raman-spectrometer for the investigation of protein crystals.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Molekulare Ionenpumpen	3
2.1	Bacteriorhodopsin	3
2.1.1	Allgemeines	3
2.1.2	Struktur und Photozyklus	4
2.2	Halorhodopsin	9
2.2.1	Allgemeines	9
2.2.2	Struktur und Photozyklus	9
3	Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben	13
3.1	Schwingungsspektroskopie	13
3.1.1	Normalmoden	13
3.1.2	Kopplung von Molekülschwingungen an elektromagnetische Wellen	13
3.1.3	Schwingungsspektroskopie an Proteinen	16
3.2	Fourier–Transform Infrarot–Spektroskopie	18
3.2.1	Spektrometerprinzip	18
3.2.2	Vom Interferogramm zum Spektrum	19
3.2.3	Zeitaufösende Messungen	22
3.2.4	ATR–Spektroskopie	24
4	Messmethoden und Auswertung	33
4.1	Zeitaufösende FTIR–Spektroskopie	33
4.1.1	Spektrometersausstattung	33
4.1.2	ATR–Aufbau	35
4.1.3	Probenpräparation	38
4.1.4	Probenanregung und Triggerung	39
4.1.5	AC–gekoppelte Messungen	40
4.1.6	Die Messmethode im Vergleich	43
4.1.7	Datenanalyse	45
4.2	Resonanz–Raman–Spektroskopie	49
4.2.1	Spektrometersausstattung	49
4.2.2	Anregungslaser	51

Inhaltsverzeichnis

4.2.3	Statische Messungen	52
4.2.4	Durchflusszelle	53
5	Ergebnisse und Diskussion	55
5.1	Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR	55
5.1.1	Probenpräparation und stationäre Messungen	55
5.1.2	SVD-Analyse der zeitaufgelösten Messungen	59
5.1.3	Lineardichroismus und Winkelberechnungen	62
5.1.4	Trennung der Intermediate	66
5.1.5	Analyse der polarisationsabhängigen Unterschiede	71
5.2	Spektroskopische Untersuchungen an HR	77
5.2.1	Präparation und Messdurchführung	78
5.2.2	Infrarotabsorptionen von HR	79
5.2.3	Messungen mit AC-Kopplung	81
5.2.4	Messungen mit DC-Kopplung	84
5.2.5	Analyse der Photozykluskinetik	89
5.2.6	Das Modell im Vergleich	92
5.3	Resonanz-Raman-Spektroskopie	94
5.3.1	Durchflussmessungen an Bacteriorhodopsin	94
5.3.2	Messungen an Halorhodopsin	97
5.3.3	Mikro-Raman-Spektroskopie an Proteinkristallen	100
5.3.4	Optische Falle mit Raman-Detektion	103
6	Zusammenfassung	107
A	Ergänzungen zu Kapitel 4	109
A.1	Step-scan Messungen mit AC-Kopplung	109
A.2	Zusammenfassung der Datenpunkte auf einer logarithmischen Skala	111
A.3	Numerische Beschreibung der Daten	112
	Literaturverzeichnis	115

1 Einleitung

Jede biologische Zelle wird durch eine Zellmembran, die im Wesentlichen aus Lipiden und eingelagerten Proteinen besteht, von ihrer Umgebung getrennt. Diese hoch selektive Barriere bildet ein Kompartiment mit deutlich unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen im Vergleich zur Umgebung und ermöglicht auf diese Weise erst die volle Funktionalität der Zelle. Darüber hinaus enthalten eukaryotische Zellen intern weitere Membranen, um zusätzliche „Funktionskammern“ (Organellen) wie Mitochondrien oder Chloroplasten zu schaffen, die spezielle Aufgaben erfüllen. Zum Austausch von Ionen und Molekülen mit der Umgebung werden in die Membran eingelagerte und diese durchspannende Proteine genutzt: Kanäle ermöglichen das diffusive oder elektrostatisch getriebene Einströmen von Ionen oder Molekülen in Richtung des entsprechenden Gradienten und werden durch Substrate oder andere Signale gesteuert. Dagegen sind Proteinpumpen in der Lage, unter Energieverbrauch *gegen* einen Gradienten zu transportieren. Ein wichtiges Beispiel solcher aktiven Transporte ist die Zwischenspeicherung von Energie in einem Protonengradienten, wie man sie in der Atmungskette und dem Photosyntheseapparat findet. Redoxgetriebene Protonenpumpen halten hier den Gradienten aufrecht, während ATP-Synthasen das Einströmen der Protonen in die Zelle zur Produktion von ATP, dem universellen Energielieferanten in biologischen Zellen, nutzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Funktionsmechanismus zweier lichtgetriebener Modellpumpen untersucht. Bacteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) finden sich in der Zellmembran des salzliebenden Archaeobakteriums *Halobacterium salinarum*. BR ermöglicht unter extremen Bedingungen als *lichtgetriebene* Protonenpumpe einen zur Atmungskette alternativen Weg der Herstellung eines Protonengradienten. HR dient als lichtgetriebene Chloridpumpe der Aufrechterhaltung der Salzkonzentration im Inneren der Zelle bei wechselnden Bedingungen. Die von beiden Proteinen bekannten Röntgenstrukturen — im Fall von BR sind darüber hinaus Strukturen einiger Photozyklusintermediate bekannt — bilden eine wichtige Grundlage zum Verständnis des jeweiligen Funktionsmechanismus. Sie können aber die Dynamik der Prozesse während des Photozyklus nicht abbilden. Diese Lücke schließt die zeitauflösende Schwingungsspektroskopie, die in der Lage ist, transiente Änderungen in der Struktur der Proteine zu detektieren.

Diese Arbeit stellt zeitaufgelöste FTIR-Messungen des Lineardichroismus von BR vor, die gerade im Hinblick auf die bekannten Röntgenstrukturen zusätzliche Informationen über die Orientierung von Übergangsdipolmomenten bzw. zugeord-

1 Einleitung

neter Bindungsstrukturen liefert. Die zeitaufgelösten FTIR-Messungen an HR erlauben in Kombination mit der ATR-Technik eine große Variabilität der äußeren Bedingungen, speziell der Chloridkonzentration, und entsprechende Schlussfolgerungen im Hinblick auf den Mechanismus. Resonanz-Raman-Messungen an beiden Proteinen liefern ergänzende Informationen zur Bandenzuordnung und demonstrieren die Möglichkeiten der Apparatur als Mikro-Raman-Spektrometer bei der Vermessung von Proteinkristallen.

2 Molekulare Ionenpumpen

2.1 Bacteriorhodopsin

2.1.1 Allgemeines

Alle Organismen sind direkt oder indirekt von der Photosynthese als Form der Energiegewinnung abhängig. Lange Zeit war die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie über das Chromophor Chlorophyll der einzig bekannte Weg in der belebten Natur. Die Entdeckung des Proteins *Bacteriorhodopsin* (BR) Anfang der siebziger Jahre [1] stellte einen alternativen Photosyntheseapparat vor.

BR findet sich in der Cytoplasmamembran des Archaeobakteriums *Halobacterium salinarum*. Dieser Organismus ist an einen Lebensraum mit extrem hoher Salzkonzentration und Temperatur angepasst und begegnet dem daraus resultierenden Sauerstoffmangel¹ mit einer alternativen Energiegewinnung: Statt einer sauerstoffverbrauchenden Atmungskette zur Erzeugung eines Protonengradienten über der Membran nutzt das Bakterium die *lichtgetriebene* Protonenpumpe BR [2]. Eine erhöhte Synthese von BR unter Sauerstoffmangelbedingungen und die Entstehung von Membransegmenten, die nur dieses Protein enthalten (sogenannte Purpurmembranen [3]) stellen die Produktion von ATP in diesem Fall sicher.

Die Beobachtung, dass BR zweidimensionale Gitter in der Purpurmembran nach Abb. 2.1 ausbildet [4], nährte die Hoffnung auf eine relativ leichte Kristallisation des Membranproteins auch in alle drei Raumrichtungen. Tatsächlich erhielt man schon in den siebziger Jahren Kristalle [5], die aber eine Strukturbestimmung mit Hilfe der Röntgenbeugung noch nicht zuließen. Lange Zeit beschränkten sich deshalb die Strukturinformationen auf Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie und Röntgenbeugung an zweidimensionalen Purpurmembranen [6]. Eine neue Methode zur Kristallisation von Membranproteinen, die Verwendung von *kubischen Lipidphasen* [7, 8], führte schließlich zu Proteinkristallen, die eine Strukturbestimmung mit hoher Auflösung ermöglichten [9].

Mittlerweile sind mehrere Strukturmodelle des Grundzustands bis zu einer Auflösung von 1.5 Å veröffentlicht [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen im Bereich der Verbindungsstücke zwischen den Helices, den Loop-Bereichen. Da dies Bereiche sind, die einerseits *in vivo* nicht unbedingt feste Strukturen besitzen, und andererseits als Kontakte der Proteine im Kristall unter

¹ Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser nimmt sowohl mit der Salzkonzentration als auch mit der Temperatur ab.

2 Molekulare Ionenpumpen

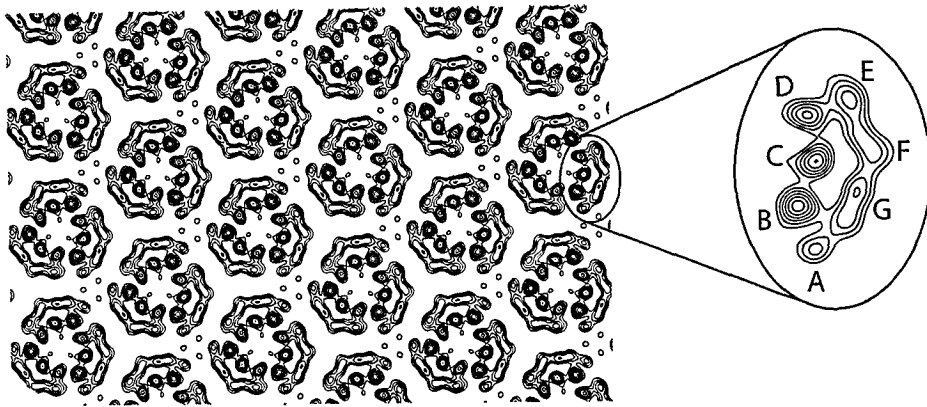


Abbildung 2.1 Karte der Elektronendichte eines zweidimensionalen BR-Gitters. Die mit Röntgenbeugung an Purpurmembranfragmenten ermittelten Daten zeigen die Projektion der Elektronendichte auf die Ebene der Membran. Man erkennt einerseits die hexagonale Anordnung der Proteintrimere in der Membran, andererseits den innermolekularen Aufbau: Die sieben senkrecht zur Membran stehenden Helices A bis F (vgl. Abb. 2.2, S. 5) sind aufgrund ihrer erhöhten Elektronendichte zu erkennen.

Umständen verformt sind, ist dies zu erwarten. Desweiteren gelang es mit Hilfe spektroskopischer Methoden, die Funktionalität von BR im Kristallverband nachzuweisen [16]. Man kann somit davon ausgehen, dass die publizierten Strukturen eng mit dem funktionellen Protein in seiner natürlichen Membran übereinstimmen.

2.1.2 Struktur und Photozyklus

BR ist ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 26.5 kDa und setzt sich zusammen aus 248 Aminosäuren und dem lichtabsorbierenden Chromophor Retinal (Abb. 2.2). Es besteht aus sieben transmembranen Helices, die das im Innern liegende Retinal einschließen, dessen Struktur und Nomenklatur in Abb. 2.3 dargestellt ist. Das auch in Sehzellen vorkommende Molekül liegt im Grundzustand in *all-trans*-Konformation vor; bei Lichtabsorption findet eine *all-trans/13-cis*-Isomerisierung statt. Die „Entspannung“ dieser Verdrillung bildet den eigentlichen Funktionszyklus, während dessen ein Proton durch das Molekül hindurch auf die andere Seite der Membran transportiert wird.

Retinal, das ungefähr in der Mitte der Cytoplasmamembran liegt (Abb. 2.5), teilt das Protein in eine cytoplasmatische Seite und eine extrazelluläre Seite, die jeweils für die Protonenaufnahme bzw. -abgabe zuständig sind. Grundlegendes Element der Protonenleitung innerhalb des Moleküls sind Aspartate und Glutamate, die eine Bindung des Protons mit Bindungsenergien im Bereich der Bildung von Hydroniumionen ermöglichen. Somit konkurrieren sie mit den Wassermolekülen

2.1 Bacteriorhodopsin

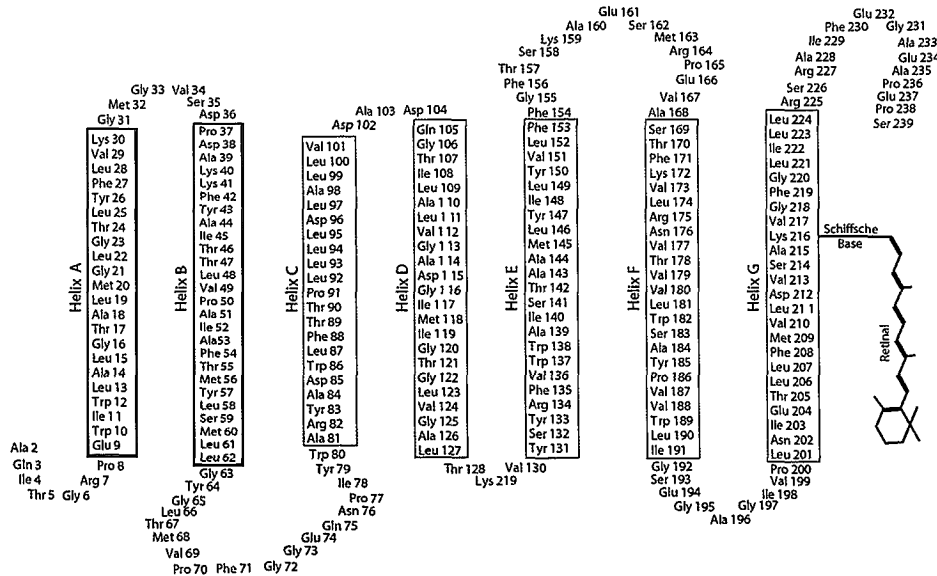


Abbildung 2.2 Aminosäuresequenz von BR und die Einteilung in die Helices A bis G, wie sie schon anhand der Hydrophobizität der Aminosäurenreste erfolgen kann. Das Retinal ist kovalent an Lys 216 gebunden.

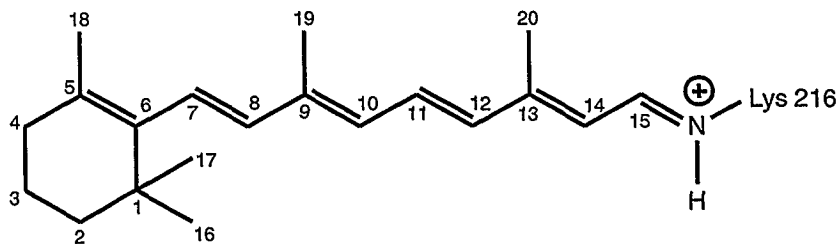


Abbildung 2.3 Struktur und Nomenklatur von Retinal. Es ist über die Schiff'sche Base an Lys 216 gebunden und führt im BR Photozyklus eine all-*trans*/13-*cis*-Isomerisierung durch.

2 Molekulare Ionenpumpen

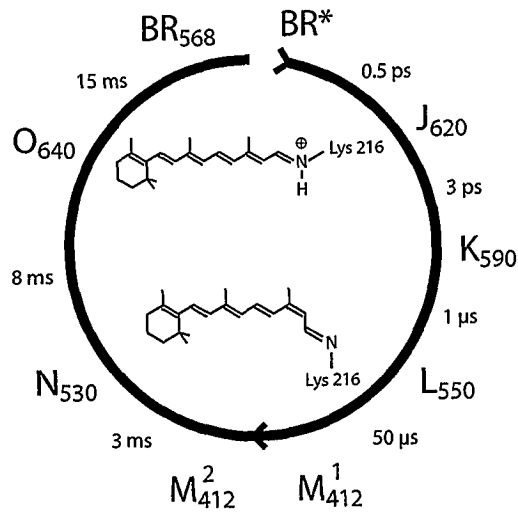


Abbildung 2.4 Photozyklus von Bacteriorhodopsin wie er anhand der Farbänderungen des Retinals festgestellt werden kann. Lediglich die Einteilung in die beiden M-Zustände erfolgt aufgrund mechanistischer Überlegungen und beschreibt die Änderung der Zugänglichkeit der Schiffchen Base.

um die Anlagerung von Protonen und können durch ein Anheben oder Absenken² des pK -Wertes der Gruppe geschaltet werden. Letzteres geschieht über Veränderungen in der Umgebung der Carboxylate, was Unterschiede im Bereich mehrerer pK -Wert-Einheiten bewirken kann.

Der Photozyklus des Proteins lässt sich über die zeitabhängigen Farbänderungen des Retinals grob in Intermediate einteilen, die in Abb. 2.4 dargestellt sind. Die folgende Liste gibt einen Überblick über diese Intermediate und die entsprechenden Veränderungen, die mit ihnen assoziiert werden³:

$BR_{568} \longrightarrow J_{620}$: Das Retinal befindet sich im lichtadaptierten⁴ Grundzustand, absorbiert ein Photon und isomerisiert um die $C_{13}=C_{14}$ Doppelbindung [18].

$J_{620} \longrightarrow K_{590} \longrightarrow L_{550}$: Die im verdrehten Retinal gespeicherte Energie dissipiert und sorgt für erste, relativ geringe Änderungen im sichtbaren Spektrums.

² Jedes eingefangene Proton muss auch wieder abgegeben werden. Die Unterschiede im pK -Wert dürfen deshalb nicht zu groß sein.

³ Die Nomenklatur der Intermediate erfolgt über Großbuchstaben in alphabetischer Reihenfolge, beginnend mit J, und einem Index, der das Maximum der Absorption des Intermediate im Sichtbaren (in Nanometern) angibt.

⁴ Das dunkeladaptierte BR liegt zu ca. 65 % im 13-*cis* Zustand vor und kann durch Licht zu 100 % in den lichtadaptierten Zustand mit all-*trans*-Retinal überführt werden [17].

2.1 Bacteriorhodopsin

$L_{550} \longrightarrow M_{412}$	: Das Proton der Schiffischen Base verschiebt sich zu Asp 85 [19]. Gleichzeitig wird ein Proton in das extrazelluläre Medium abgegeben ⁵ [20]. Die aus der Abgabe des Protons stark veränderte Elektronenstruktur des Retinals ist an der starken Blauverschiebung des Absorptionsmaximums erkennbar.
$M_{412} \longrightarrow M'_{412}$	: Die Zugänglichkeit der Schiffischen Base ändert sich zugunsten der cytoplasmatischen Seite, um eine Reprotonierung zu ermöglichen. Dieser Übergang ist mit sichtbarer Spektroskopie nicht beobachtbar und somit durch den gleichen Buchstaben gekennzeichnet.
$M'_{412} \longrightarrow N_{530}$	: Die Schiffische Base wird durch Asp 96 reprotoniert [21, 22, 23].
$N_{530} \longrightarrow O_{640}$	: Asp 96 wird aus Richtung des Cytoplasmas reprotoniert und ein Proton aus dem Inneren der Zelle aufgenommen [24]. Gleichzeitig findet eine Rückkehr des Retinals in den <i>all-trans</i> -Grundzustand statt [25].
$O_{640} \longrightarrow BR_{568}$	: Asp 85 gibt sein Proton ab und das Protein kehrt damit in den Grundzustand zurück.

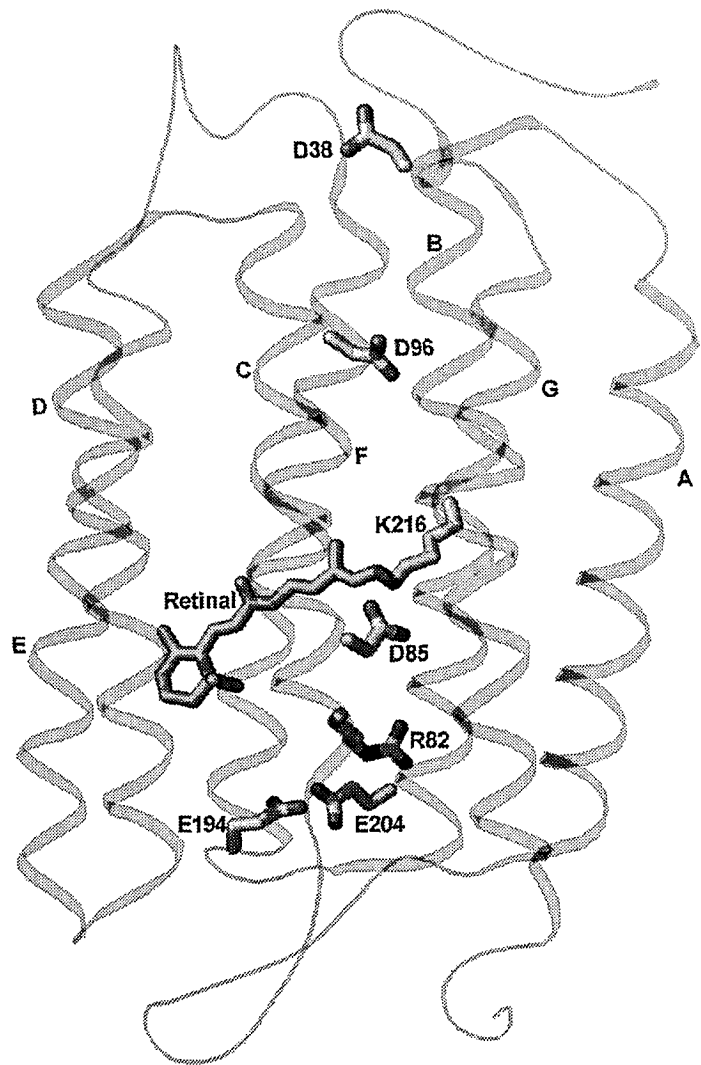
Diese Zuordnung von beobachteten Änderungen im sichtbaren Spektrum zu funktionellen Vorgängen im Protein konnte bereits ohne eine hochauflösende Struktur vorgenommen werden.

Die in der letzten Zeit zu den Röntgenstrukturen des Grundzustandes hinzugekommenen Strukturen einiger Intermediate [26, 27, 28, 15] verfeinern dieses bekannte Bild und erweitern die Sicht auf den Funktionszyklus von BR. In Abb. 2.5 sind die Sekundärstrukturelemente von BR eingezeichnet zusammen mit Aminosäureseitenketten, die mit großer Wahrscheinlichkeit am Protonentransport beteiligt sind. Der untere und damit für die Protonenabgabe zuständige Bereich des Proteins bildet einen Protonenleitweg angefangen bei der Schiffischen Base, über Asp 85, ein Wassermolekül zwischen Asp 85 und Asp 212 und endet an der Dyade Glu 194/Glu 204, die in unmittelbarer Nähe der Oberfläche des Proteins liegen. Zwischen Asp 85 und der Dyade liegt Arg 82, dem aus theoretischen Überlegungen heraus eine schaltende Funktion angedacht wird [29]. Dies wird in der späten M-Struktur von SASS *et. al.* bestätigt: Arg 82 vollführt zwischen Grundzustand und M eine starke Drehung und orientiert sich extrazellulär in Richtung der Dyade, die ihrerseits durch eine große Bewegung von Glu 204 getrennt wird. In [15] wird diese Veränderung in der Kette der Wasserstoffbrücken zwischen Dyade und

⁵ Bei einem pH-Wert unterhalb von 6 findet die Protonenfreisetzung erst mit der Rückkehr in den Grundzustand statt.

2 Molekulare Ionenpumpen

Abbildung 2.5 Der dreidimensionale Aufbau von BR im Grundzustand in einer vereinfachten Darstellung, bei der nur das Proteinrückgrat, das Retinal und wichtige Aminosäurenreste dargestellt sind. Die Glutamate und Aspartate im unteren, extrazellulären Bereich des Proteins bilden bereits im Grundzustand eine Kette von Wasserstoffbrückenbindungen, die den Weg des Protons vorzeichnen. Im cytoplasmatischen Teil des Proteins sind zur Reprotonierung der Schiffischen Base Strukturänderungen nötig. Die entstehenden Hohlräume können Wassermoleküle aufnehmen, die dann als Wasserstoffbrückennetzwerk das Verschieben eines Protons erlauben.



mehreren Wassermolekülen als Signal zur Freisetzung des Protons ins extrazelluläre Medium bei Protonierung von Asp 85 angesehen. Dabei dient entweder eine der Glutamate direkt als protonenfreisetzende Gruppe [30], was aber gegen neuere Infrarot-Messungen spricht [31], oder aber ein Netzwerk aus Wassermolekülen vermittelt eine indirekte Abgabe an das umgebende Medium [32]. Die Deprotonierung von Asp 85 im Übergang vom O-Intermediat in den Grundzustand erfolgt über eine transiente Protonierung von Asp 212 [33] und die abschließende Protonierung der freisetzenden Gruppe.

Aufgrund der weniger dichten Verteilung von protonierbaren Seitenketten und Wassermolekülen im cytoplasmatischen Bereich des Proteins ist der Weg der Reprotonierung der Schiffischen Base weniger offensichtlich. Da Asp 96 am Protonentransport beteiligt ist [21, 22, 23], stellt sich die Frage nach einem Weg von dort zur Schiffischen Base sowie nach dem Weg vom Cytoplasma zu Asp 96. Ersterer scheint

2.2 Halorhodopsin

im Grundzustand durch hydrophobe Aminosäureseitenketten blockiert. Nach der M-Struktur [15] ändert sich dies allerdings in diesem Intermediat: Durch das nach außen Biegen von Helix F und das Öffnen von Helix G treten Strukturänderungen auf, die Hohlräume im Protein schaffen. Diese werden durch in der Röntgenstruktur nachweisbare Wassermoleküle besetzt, die ein Wasserstoffbrückennetzwerk von Asp 96 bis auf 5.8 Å an die Schiff'sche Base heran schaffen. Der letzte Schritt zum Retinal muss entweder über Fluktuationen eines Wassermoleküls das Proton näher heranbringen, oder weitere Strukturänderungen treten auf, die die Hohlräume weiter vergrößern.

Im Rahmen der Strukturänderungen des Proteinrückgrates entstehen oberhalb von Asp 96 in Richtung des Cytoplasmas ebenfalls Hohlräume, die allerdings von einer engen Einschnürung durch hydrophobe Seitenketten voneinander getrennt sind. In beiden Hohlräumen werden Wassermoleküle gemessen, obwohl der an Asp 96 grenzende von hydrophoben Seitenketten umgeben ist und somit eine extrem ungewöhnliche Wasserposition darstellt. Zusammen mit thermischen Fluktuationen können die Hohlräume und dementsprechend eindringende Wassermoleküle aber eine Reprotonierung von Asp 96 erklären. Ausgangspunkt auf der cytoplasmatischen Oberfläche ist wahrscheinlich Asp 38, dessen entscheidende Bedeutung in diesem Schritt durch spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen wurde [34]. Die weiteren Aspartate und Glutamate an der Oberfläche des Proteins bilden offenbar eine negativ geladene Antenne, die gerade bei hohem pH-Wert die lokale Konzentration von Protonen am Eingang des Reprotonierungsweges erhöht [34].

2.2 Halorhodopsin

2.2.1 Allgemeines

Nachdem es bereits im Jahr 1975 erste Anzeichen dafür gab, dass Bacteriorhodopsin nicht die einzige lichtgetriebene Ionenpumpe in Halobakterien ist [35], wurde 1979 die Existenz einer solchen Pumpe nachgewiesen [36] und schließlich als *Halorhodopsin* bezeichnet [37, 38]. Allerdings wurde eine Spezifität auf Natriumionen vorgeschlagen, was in weiteren Experimenten untermauert wurde. Erst nach einer erstaunlich umfassenden Charakterisierung des Proteins kam 1982 die Hypothese einer *Chloridpumpe* auf [39] und wurde schließlich verifiziert. Ausführliche Zusammenfassungen zu HR finden sich in [40, 41].

2.2.2 Struktur und Photozyklus

HR ist ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 26 kDa und wird aus 274 kodierte Aminosäuren gebildet. In der Literatur finden sich Untersuchungen der Halorhodopsine von *Halobacterium salinarum* und *Natronobacterium pharaonis*, die eine Sequenzhomologie von ca. 65 % untereinander und ca. 30 % zu BR

2 Molekulare Ionenpumpen

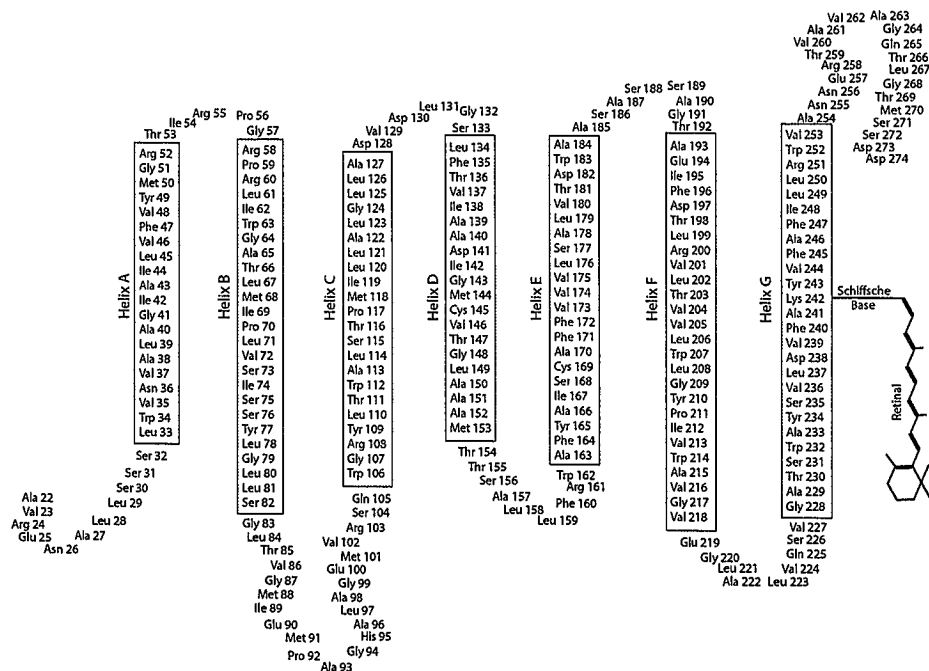


Abbildung 2.6 Aminosäuresequenz von HR und die Einteilung in die Helices A bis G, wie sie schon anhand der Hydrophobizität der Aminosäurenreste erfolgen kann. Das Retinal ist kovalent an Lys 242 gebunden.

aufweisen. Im Folgenden beziehen sich die Angaben auf das im Rahmen dieser Arbeit verwendete HR aus Halobakterien, für das auch die Röntgenstruktur im Jahr 2000 erschien [42]. Die enge Verwandtschaft zu BR bestätigt eine Analyse der Aminosäuresequenz in Abb. 2.6, die analog zu BR sieben transmembrane Helices vorschlägt. Das Retinal ist an Lys 242 gebunden und kann im Grundzustand sowohl in *all-trans* als auch *13-cis* Konformation vorliegen. Die Analyse des Photozyklus wird dadurch erschwert, dass im Gegensatz zu BR auch nach Lichtadaption weniger als 100 % der Proteine in *all-trans*-Konfiguration vorliegen. Ein paralleler *13-cis*-Photozyklus kann demnach in allen kinetischen Studien vorhanden sein, wird aber im Allgemeinen vernachlässigt.

Ein Modell des *all-trans*-Photozyklus in Übereinstimmung mit [40, 41] ist in Abb. 2.7. dargestellt und beruht im Wesentlichen auf Messungen im Sichtbaren bei Chloridkonzentrationen im Bereich von 1 mol/l für den chloridbeladenen und Nitratkonzentrationen von 1 mol/l für den chloridfreien Photozyklus⁶. Das primäre Intermediat HR_{600} in beiden Zyklen ist rotverschoben und ähnelt dem K-

⁶ Nitrat wird bei HR aus *Halobacterium salinarum* nur zu einem Bruchteil des Chloridumsatzes gepumpt und im Allgemeinen vernachlässigt.

2.2 Halorhodopsin

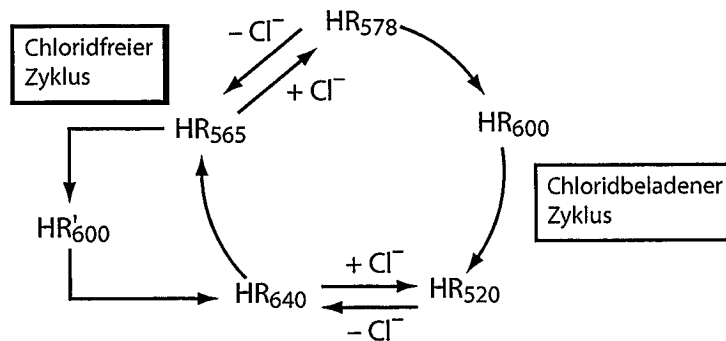


Abbildung 2.7 Photozyklusmodell für Halorhodopsin nach [40, 43]. Die beiden Zyklen für den chloridfreien und -beladenen Fall greifen ineinander und zeigen zwei chloridabhängige Schritte.

Intermediat im Photozyklus von BR⁷. Der Zerfall von HR₆₀₀ erfolgt im beladenen Zyklus chloridunabhängig [44] oder mit geringer Abhängigkeit [45] zum blauverschobenen Intermediat HR₅₂₀, das auch anhand von Raman-Spektren [46], die ein protoniertes 13-*cis*-Retinal zeigen, dem L-Intermediat in BR entspricht. Der Übergang zum Intermediat HR₆₄₀ erfolgt chloridabhängig und lässt dieses Intermediat spektroskopisch nur bei geringen Chloridkonzentrationen sichtbar werden. Der Zerfall dieses O-Intermediates in den Grundzustand HR₅₇₈ erfolgt ebenfalls chloridabhängig und durchläuft in diesem Modell den Grundzustand des chloridfreien Zyklus. Dieser letztere Zyklus bildet nach dem Zerfall des K-ähnlichen Intermediates ebenfalls das Intermediat HR₆₄₀ und kehrt über dessen Zerfall in seinen Grundzustand zurück. Die Einbindung dieses Grundzustandes in den chloridbeladenen Photozyklus erfolgte allerdings aus mechanistischen Gründen und ein spektroskopischer Nachweis ist bisher nicht erbracht.

Die beiden gegensätzlich chloridabhängigen Schritte im chloridbeladenen Zyklus legen die Zuordnung der Chloridabgabe zum Übergang zwischen HR₅₂₀ und HR₆₄₀, und der Chloridaufnahme zwischen HR₅₆₅ und dem Grundzustand HR₅₇₈ nahe. Allerdings muss dieses Photozyklusmodell im Vergleich zum etablierten Modell der BR-Photoreaktion (Abb. 2.4) als umstritten angesehen werden. Gerade die spektroskopisch schwer beobachtbaren Intermediate HR₆₄₀ (bei hoher Chloridkonzentration kaum beobachtbar) und HR₅₆₅ (kein spektroskopischer Hinweis auf Teilnahme am chloridbeladenen Photozyklus [41]) sind recht umstritten und werden in neueren Modellen nicht berücksichtigt [44].

In der Röntgenstruktur von Halorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* [42] finden sich trotz der großen funktionellen Unterschiede zu BR (BR pumpt Protonen von innen nach außen, HR Chloridionen von außen nach innen) gerade im

⁷Die Nomenklatur in [40] ist dementsprechend an BR angelehnt, so dass dieses Intermediat HR_K genannt wird.

2 Molekulare Ionenpumpen

membranständigen Teil gut übereinstimmende Strukturen. Wie bei BR ergeben sich sieben transmembrane Helices, die das ungefähr in der Mitte der Membran liegende Retinal einschließen. Die Position eines Chloridions in der Struktur in unmittelbarer Nähe des Stickstoffs der Schiffischen Base deutet auf einen Mechanismus hin, der wie bei BR an die Isomerisierung des Retinals gekoppelt ist. Letzteres findet sich dementsprechend in *all-trans*-Konfiguration. Das Chloridion befindet sich im Vergleich zur BR-Struktur an der Stelle, die dort ein Sauerstoff von Asp 85, dem primären Protonenakzeptor, einnimmt und bildet zusammen mit Asp 238 und Arg 108 die Gegenladung zur protonierten Schiffischen Base. Solvatisiert wird das Ion im Wesentlichen durch 15 Wasserstoffe, die einerseits von aliphatischen Seitenketten, andererseits von drei umgebenden Wassermolekülen stammen.

Ein Weg von der extrazellulären Seite zu dieser Bindungsstelle wird durch einen Kanal nahe gelegt, der sich — lediglich durch Arg 108 blockiert — von der extrazellulären Seite bis in die Nähe der Schiffischen Base zieht. Eine gezielte Konformationsänderung von Arg 108 bzw. eine erhöhte Flexibilität ermöglicht somit eine Besetzung der Chloridbindestelle. Im Gegensatz dazu findet sich auf der cytoplasmatischen Seite kein solch offener Kanal und Konformationsänderungen zur Abgabe des Chloridions nach innen werden vorgeschlagen. Im Speziellen erscheint das C-terminale Ende von Helix E als möglicher Faktor zur Öffnung eines chlorid-freisetzenden Kanals.

Die Zuordnung der Photozyklusintermediate zu den strukturellen Veränderungen im Protein aufgrund der Röntgenstruktur sieht folgendermaßen aus: Im Übergang zu HR₆₀₀ dreht sich im Rahmen der Isomerisierung die N-H-Bindung der Schiffischen Base in die cytoplasmatische Richtung und verändert damit den energetischen Zustand des Chloridions, das von Asp 238 abgestoßen wird. Im nächsten Schritt beim Übergang zu HR₅₂₀ folgt das Chloridion dem Proton der Schiffischen Base und wird durch Thr 203 und das Wasser 506 wasserstoffbrückengebunden. Der anschließende Weg zum Cytoplasma ist blockiert, so dass im nächsten Schritt Konformationsänderungen notwendig werden. Da zusätzlich polare Gruppen zur Solvatisierung fehlen, wird im Rahmen dessen das Eindringen von Wasser vorgeschlagen. Im Einklang mit neueren spektroskopischen Daten wird dieser Schritt als Übergang zwischen *zwei* HR₅₂₀-Intermediaten angesehen [47]. Die Trennung des Chloridions von der Schiffischen Base geht mit der Rotverschiebung der Retinalabsorption im Intermediat HR₆₄₀ und der Abgabe ins Cytoplasma einher. In den verbliebenen Schritten wird dieser Weg wieder geschlossen, das Retinal reiso-merisiert (HR₅₆₅) und die Chloridbindungsstelle wird wieder besetzt (HR₅₇₈).

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

3.1 Schwingungsspektroskopie

3.1.1 Normalmoden

Ein Molekül, welches aus N Atomen besteht, hat $3N$ Freiheitsgrade der Bewegung. Die Translation bzw. Rotation des Moleküls als ganzem liefert jeweils 3 Freiheitsgrade, so dass insgesamt $3N - 6$ Bewegungsmöglichkeiten existieren, bei denen sich die interatomaren Abstände verändern. Der Hamilton-Operator für solch ein System hat folgende Form:

$$\mathcal{H} = \sum_i \frac{p_i^2}{2m} + V(x_1, x_2, \dots, x_N) \quad (3.1)$$

Die potentielle Energie lässt sich entwickeln:

$$V = V_0 + \sum_i \left(\frac{dV}{d\Delta x_i} \right)_0 \Delta x_i + \frac{1}{2} \sum_{ij} \left(\frac{d^2 V}{d\Delta x_i d\Delta x_j} \right)_0 \Delta x_i \Delta x_j + \dots \quad (3.2)$$

Setzt man das Minimum der potentiellen Energie gleich Null, so fallen die ersten beiden Terme weg und man kann in guter Näherung nur den Term zweiter Ordnung in Gleichung (3.1) benutzen. In diesem Fall lässt sich der Hamiltonoperator diagonalisieren und man erhält $3N - 6$ entkoppelte *harmonische* Oszillatoren mit entsprechenden Normalschwingungen.

3.1.2 Kopplung von Molekülschwingungen an elektromagnetische Wellen

Jede der im vorigen Abschnitt eingeführten Normalschwingungen oder -moden kann vom Grundzustand in einen angeregten Zustand mit höherer Energie übergehen. In der Spektroskopie werden solche Übergänge durch die Wechselwirkung mit elektromagnetischen Wellen induziert; im Speziellen wird zur Anregung von Molekülschwingungen die Infrarotspektroskopie bzw. die Ramanspektroskopie benutzt.

Abb. 3.1 zeigt im Energie-Schema die prinzipiellen Unterschiede zwischen In-

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

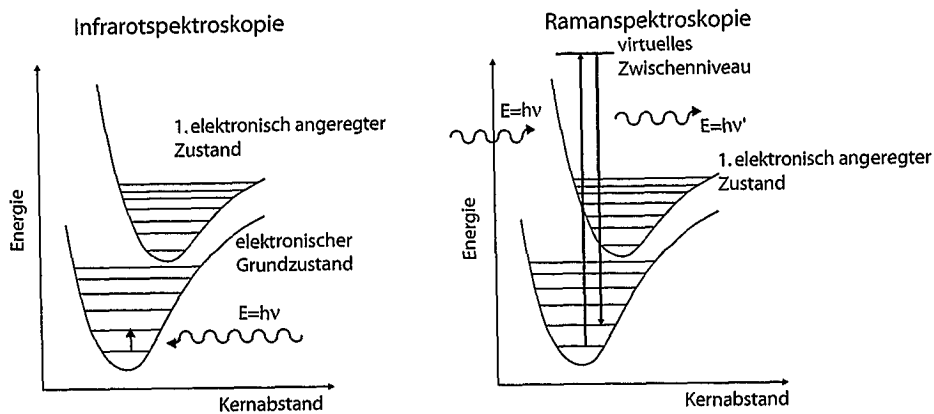


Abbildung 3.1 Vergleich zwischen Infrarotspektroskopie und Ramanspektroskopie im Energie-Diagramm. In der Infrarotabsorption wird die Energie des Photons komplett absorbiert, der Raman-Effekt ist ein Zwei-Photonen-Prozess, bei dem ein virtuelles Zwischenniveau angeregt wird.

frarotspektroskopie und Ramanspektroskopie: Die Energie des einfallenden Photons wird in der Infrarotspektroskopie komplett genutzt, um den Übergang anzuregen; beim Raman-Effekt dagegen handelt es sich nominell um einen Streuprozess, bei dem die Frequenz des gestreuten Photons moduliert wird. Eine anschauliche Darstellung geht von einem virtuellen Zwischenniveau aus, was instantan zerfällt und in einen angeregten Zustand zurückfällt.

Die Aufnahme eines Schwingungsspektrums, d.h. eines Überblicks über die anregbaren Schwingungen im Molekül erfolgt bei der Infrarotspektroskopie über die Beleuchtung mit einem Wellenlängenkontinuum und der Analyse der absorbierten Frequenzen. In der Ramanspektroskopie wird dagegen mit einer Laserwellenlänge eingestrahlt und die dagegen verschobenen, gestreuten Ramansignale detektiert. Ein Beispiel dazu zeigt Abb. 3.2. Dargestellt ist ein Siliziumspektrum, das mit einer Anregungswellenlänge von 458 nm aufgenommen wurde. Im oberen Teil der Abbildung ist das Streuspektrum mit einer Nanometerskala als Abszisse dargestellt. Man erkennt die sehr starke Rayleighstreuung des Anregungslasers und dagegen verschobene Frequenzen. Die beiden Linien im Bereich von 460 nm sind Linien des Laserplasmas, die nicht vollständig herausgefiltert wurden. Bei 469 nm allerdings liegt eine bekannte Ramanlinie von Silizium, die der Anregung einer Gitterschwingung zuzuordnen ist. Die Wellenlänge ist rotverschoben und damit energieärmer und entspricht dem Schema in Abb. 3.1. Allerdings findet sich auch eine blauverschobene Linie bei 447 nm. In der unteren Darstellung wurde die gleiche Messung auf einer Wellenzahlenskala dargestellt, bei der die Frequenz des Laserlichts auf Null gesetzt wurde. Damit offenbart sich die Ursache der blauverschobenen Linie: Auf dieser Skala, die proportional zur Energiedifferenz des Schwingungsübergangs

3.1 Schwingungsspektroskopie

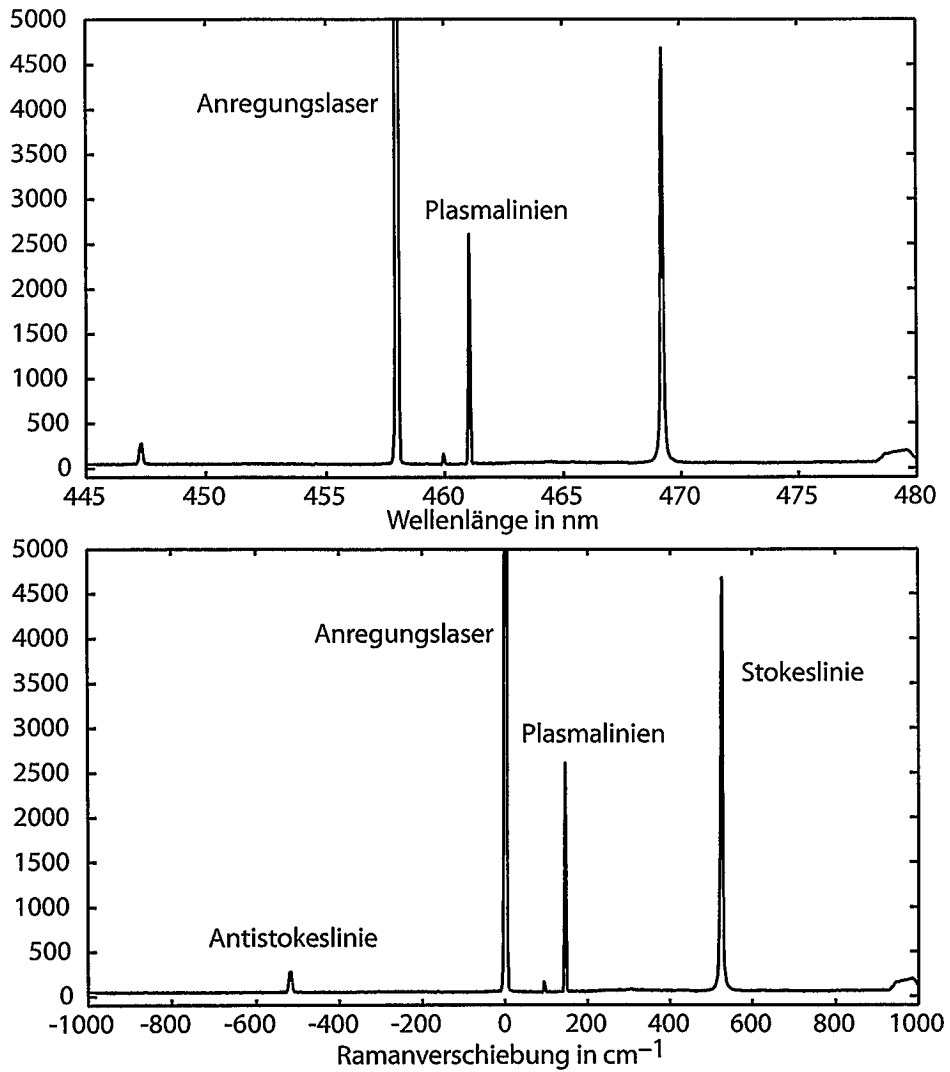


Abbildung 3.2 Beispiel einer Raman-Messung an Silizium, die im oberen Teil auf einer Nanometerskala der Detektionswellenlänge dargestellt ist. Im unteren Teil erfolgte die Umrechnung auf die Energiedifferenz zur Anregungswellenlänge in Wellenzahlen. Dabei wird die gleiche Ursache von Stokes und Antistokeslinie sichtbar.

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

ist, liegen die beiden Siliziumbanden gleich weit von der Anregung entfernt. Es handelt sich um ein sogenanntes Stokes/Antistokespaar: Wenn die Schwingung bereits in einem angeregten Zustand ist, kann beim Raman-Effekt ein Zurückspringen in den Grundzustand beobachtet werden, was eine erhöhte Energie des gestreuten Photons zur Folge hat. Das Verhältnis der Bandenhöhen zwischen Stokes und Antistokes hängt von den Besetzungszahlen der entsprechenden Zustände ab und kann über die Boltzmannstatistik zur Temperaturmessung genutzt werden.

Sowohl Infrarot- als auch Ramanspektroskopie untersuchen somit die Schwingungszustände eines Moleküls¹. Allerdings ist die Art der Wechselwirkung zwischen der Lichtwelle und dem Molekül unterschiedlich: Voraussetzung für eine Infrarotaktivität eines Übergangs ist die Änderung des permanenten *Dipolmoments* der Schwingung. Beim Auftreten des Ramaneffektes dagegen muss die Änderung der *Polarisierbarkeit* des Moleküls mit der Normalkoordinate ungleich Null sein. Beispielsweise sind zweiatomige Moleküle mit gleichen Kernen aufgrund des fehlenden permanenten Dipolmoments nicht infrarotaktiv, sehr wohl aber ramanaktiv. Im Hinblick auf Proteine allerdings ist aufgrund der starken Kopplung der Normalmoden in den meisten Fällen sowohl Infrarot- als auch Ramanaktivität zu beobachten.

3.1.3 Schwingungsspektroskopie an Proteinen

Infrarotspektroskopie

Für ein Protein mit Hunderten von Atomen ergibt sich bei $3N - 6$ Normalschwingungen eine unüberschaubare Menge an Absorptionsbanden, so daß die Interpretation eines Absolutspektrums nahezu unmöglich ist. Zur Untersuchung der Funktion ist dies aber auch nicht notwendig: Kann man die Vorgänge im Protein gezielt starten, so erlauben *Differenzspektren* die Aufklärung der *Strukturunterschiede*. Die induzierten Veränderungen bestehen entweder aus neu auftretenden Bindungen und damit neuen Normalschwingungen, oder aus Variationen der bestehenden Bindungen. Im letzteren Fall sorgen Konformationsänderungen in einem bestimmten räumlichen Bereich für eine Verschiebung der Absorptionsbanden. Vorher/Nachher – bzw. zeitaufgelöste Messungen des Infrarotspektrums können diese Vorgänge aufzeichnen und erlauben mit Hilfe von Strukturkenntnissen des Proteins Aussagen über die eigentlichen strukturellen Vorgänge im Molekül. Die technischen Grundlagen der Infrarotspektroskopie, die im Vergleich zu Messungen im UV/VIS deutlich aufwendiger ist, werden in Abschnitt 3.2 erläutert.

Will man die Funktion biologischer Moleküle untersuchen, so muss man dies zwangsläufig unter mehr oder weniger — je nach Größe des Funktionsbereichs — natürlichen Bedingungen tun. Das bedeutet für Proteine in den meisten Fällen

¹ Im Allgemeinen lassen sich ebenfalls Rotationszustände detektieren. Im Hinblick auf biologische und damit wässrige Proben wird hierauf aber nicht eingegangen.

3.1 Schwingungsspektroskopie

Messungen in wässriger Lösung. Betrachtet man einerseits den interessanten Infrarotbereich zwischen 1000 cm^{-1} und 2000 cm^{-1} und andererseits die sehr kleinen Signale der Änderungen im Protein, so ist offensichtlich, daß die sehr starke Wasserabsorption eine Messung unmöglich machen kann. Man muss also die Weglänge des Strahls durch H_2O minimieren, was bei Messungen in Transmission zu sehr dünnen abgeschlossenen Probenzellen führt. Diese erschweren damit aber z.B. die Variation anderer Parameter wie pH-Wert oder Salzkonzentration während einer Messung. Mit Hilfe der sogenannten *attenuated total reflection* (ATR) –Spektroskopie lassen sich die oben dargestellten Probleme lösen, wodurch sich diese Technik zu einer wertvollen Methode zur Untersuchung von biologischen Proben entwickelt hat. Die Grundlagen dieser Technik werden in Abschnitt 3.2.4 dargestellt.

Ramanspektroskopie

Da die Ramanbanden immer relativ zur Anregungswellenlänge verschoben sind, lässt sich durch geeignete Wahl dieser Laserlinie das Schwingungsspektrum in den sichtbaren Wellenlängenbereich transponieren. Die oben beschriebenen Probleme mit der Wasserabsorption zeigen sich damit nicht. Zusätzlich ist der apparative Aufwand somit deutlich geringer und wird in Abschnitt 4.2.1 erläutert.

Allerdings stellt sich die Frage, welche zusätzlichen Erkenntnisse ein Ramanpektrum liefert, wenn im Fall von Proteinen, wie oben erwähnt, die Schwingungsmoden so viele Atome umfassen, dass sich Banden sowohl im Infraroten als auch im Ramanspektrum zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit wird deshalb in allen Messungen ein zusätzlicher Effekt ausgenutzt: Liegt das in Abb. 3.1 dargestellte virtuelle Zwischenniveau genau auf der Höhe eines anregbaren *elektronischen* Übergangs, dann ist die Raman–Streuintensität um mehrere Größenordnungen verstärkt. Dieser Resonanz–Raman genannte Effekt lässt sich im Sichtbaren also mit *farbigen* Proteinen ausnutzen und sorgt für Ramanspektren, bei denen die Banden des Chromophors so groß sind, dass sie die Streuungen des normalen Ramaneffektes völlig überdecken. Diese Verringerung der Informationsdichte in den Schwingungsspektren erlaubt damit die Zuordnung der Chromophorbanden und trennt diese von der restlichen Proteinabsorption.

Die obige Verlagerung der Ramandetektion in den sichtbaren Wellenlängenbereich in Kombination mit der Einstrahlung in einen elektronischen Übergang hat unter Umständen einen hohen Fluoreszenzuntergrund zur Folge, der prinzipiell gut von den schmalen Ramanbanden unterschieden werden kann. Allerdings ist eine einfache Korrektur der Basislinie nicht immer möglich: Beispielsweise werden bei Verwendung eines CCD–Chips als Detektor die geringen Sensitivitätsunterschiede der einzelnen Pixel bei hohem Untergrund so groß, dass sie die Ramansignale überdecken können. Da aber die Lage des Fluoreszenzspektrums unabhängig von der Anregungswellenlänge ist, kann durch deren Variation die Ramandetektion wiederum so verschoben werden, dass das Störsignal gering ist. Die als Folge nicht

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

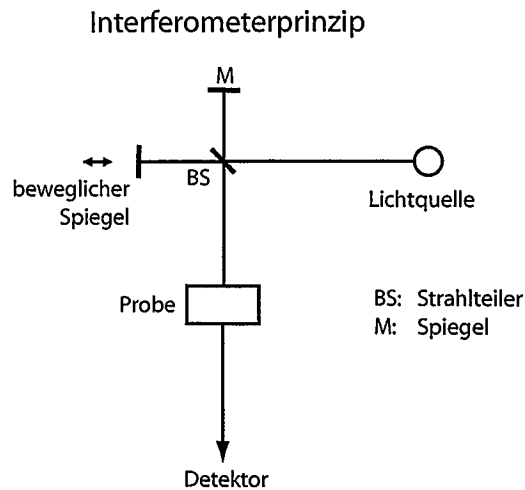


Abbildung 3.3 Schematischer Aufbau eines FTIR-Spektrometers: Der Infrarotstrahl wird in das MICHELSON-Interferometer eingekoppelt und moduliert. Der austretende Strahl gelangt durch die Probe auf den Detektor.

perfekt resonant ausgeführte Anregung sorgt allerdings in vielen Fällen für signifikante Änderungen im Ramanspektrum.

3.2 Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie

3.2.1 Spektrometerprinzip

In konventionellen Infrarotspektrometern wird der zu analysierende Infrarotstrahl durch ein Gitter in seine Frequenzen aufgespalten und die Intensität in Abhängigkeit der Frequenz durch ein Detektorelement gemessen. In nahezu allen modernen Spektrometern allerdings kommt mittlerweile die sogenannte Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie (FTIR) zum Einsatz. Zentrales Element bei diesen Geräten ist ein MICHELSON-Interferometer, das die Zuordnung von Intensität und Wellenlänge ermöglicht und damit das Gitter ersetzt. Ein prinzipieller Aufbau ist in Abb. 3.3 dargestellt. Die Lichtquelle strahlt in das Interferometer, das einen beweglichen Spiegel besitzt und die heraustretenden überlagernden Strahlen um den Weg δ versetzt. Damit ergibt sich für das elektrische Feld einer monochromatischen Welle

$$E(x, t) = E_0 \sin(kx - \omega t)$$

am Ausgang des Interferometers

$$E_{ges} = \frac{1}{2} E_0 [\sin(kx - \omega t) + \sin(kx - \omega t + k\delta)]$$

3.2 Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie

und nach Anwendung eines Additionstheorems:

$$E_{ges} = E_0 \sin\left(kx - wt + \frac{k\delta}{2}\right) \cos\left(\frac{k\delta}{2}\right)$$

Am Detektor wird eine über die Zeit gemittelte Intensität gemessen, so dass sich nach Quadrierung, Integration und dem Wegfall einiger konstanter Terme für die gemessene Intensität in Abhängigkeit der Wegdifferenz ergibt:

$$I(\delta) \propto E_0^2 \cos(k\delta) = I(\nu) \cos(2\pi\nu\delta)$$

Eine Erweiterung auf ein Wellenlängenkontinuum zeigt schließlich den Zusammenhang zwischen einer Intensitätskurve in Abhängigkeit der Spiegelstellung und der Intensität in Abhängigkeit der Frequenz:

$$\begin{aligned} I(\delta) &\propto \int_0^\infty I(\nu) \cos(2\pi\nu\delta) d\nu \\ I(\nu) &\propto \int_0^\infty I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d\delta \end{aligned}$$

Die Kurven lassen sich durch eine einfache Fouriertransformation ineinander überführen, so dass das Verfahren des Spiegels und die gleichzeitige Aufzeichnung des Detektorsignals in ein Infrarotspektrum umgerechnet werden können. Abb. 3.4 zeigt diesen Zusammenhang für eine Reihe von Spektren, angefangen bei monochromatischem Licht, über zwei Wellenlängen, eine Bande endlicher Breite und ein typisches Wellenlängenkontinuum, wie es von einem Globar emittiert wird und einige Gasabsorptionen aufweist.

Die Vorteile dieser Fourier-Transform-Spektrometer gegenüber konventionellen Gitter-Spektrometern sind folgende:

- Eine bei diesen Geräten mögliche runde Apertur hat einen deutlich höheren Strahlungsdurchlass (Jacquinot-Vorteil).
- Alle Frequenzen treffen gleichzeitig auf den Detektor (Fellgett-Vorteil).
- Ein in den Infrarotstrahlengang eingekoppelter HeNe-Laser kann mit einem Signal wie in Abb. 3.4 A als Frequenzstandard dienen und macht damit aufwendige Kalibrierungen überflüssig (Connes-Vorteil).
- Vergleichsweise einfache Messmethoden machen hohe Zeitaufösungen möglich (siehe Abschnitt 3.2.3).

3.2.2 Vom Interferogramm zum Spektrum

Die Datenaufnahme des Interferogramms erfolgt über einen Analog/Digital-Wandler, der eine endliche Anzahl an Datenpunkten liefert. Genauso ist der Verfahrensweg des Spiegels endlich, so dass die direkte Anwendung einer Fourier-Transformation auf das Interferogramm $I(x_i)$ das „wahre“ Infrarotspektrum verfälscht. Die deshalb notwendigen Korrekturen werden im Folgenden erläutert:

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

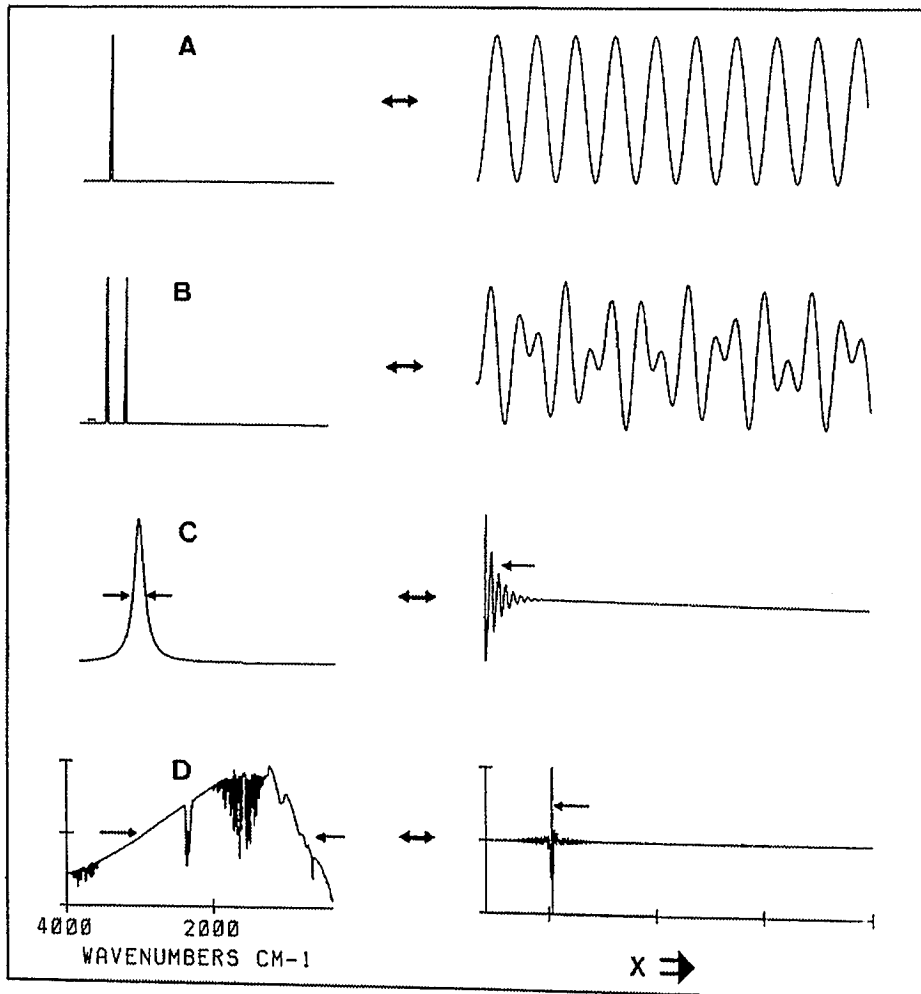


Abbildung 3.4 Der Zusammenhang zwischen einem in das Interferometer eingekoppelten Spektrum und dem Detektorsignal in Abhängigkeit der Spiegelverschiebung (entnommen aus [48]). In A ist das Signal einer monochromatischen Welle dargestellt, die in Abhängigkeit des Verfahrensweges zwischen konstruktiver und destruktiver Überlagerung wechselt. Bei zwei Linien in B ergibt sich eine Schwebung mit Maxima, an denen beide Wellenlängen konstruktiv überlagern. Bei einer Bande endlicher Breite in C findet sich nur eine einzige Spiegelstellung, an der alle Wellenlängen gleichzeitig konstruktiv überlagern, wenn nämlich die Weglängen der beiden Interferometerarme gleich sind. Man spricht von einer *centerburst*-Position. Dies trifft analog auf das Spektrum in D zu, bei dem ein typisches Interferogramm mit *centerburst* entsteht, das an den Rändern nach Null hin ausläuft. Bei dieser letzten Abbildung ist ein typischer Ausschnitt dargestellt, wie ihn das Spektrometer aufnimmt: Das Interferogramm ist nur teilweise doppelseitig und wird in einer Richtung deutlich weiter erfasst.

3.2 Fourier–Transform Infrarot–Spektroskopie

Apodisation

Die Interferogramme enthalten analog zu Abb. 3.4 D nur einen kleinen doppel-seitigen Teil, d.h. vom *centerburst* ausgehend, der Position bei keiner Weglängen-differenz, wird nicht symmetrisch in beide Richtungen abgetastet. Der doppel-seitige Bereich dient der Phasenbestimmung (s.u.). Die endliche Spiegelauslenkung sorgt mathematisch für eine Multiplikation des wahren Interferogramms mit einer Rechtecksfunktion. Dementsprechend ist das resultierende Spektrum nach der Fourier–Transformation mit der Fouriertransformierten des Rechtecks gefaltet, was zu sogenannten Füßen neben den Banden führt. Um dies zu verhindern und ein langsames Auslaufen auf Null zu erreichen, wird eine sog. Apodisationsfunktion anmultipliziert, die ein Maximum von 1 am *centerburst* besitzt und an den Enden auf Null zurückgeht. Im einfachsten Fall kann eine Dreiecksfunktion gewählt werden, die Firma *Bruker* benutzt als Standard eine Happ–Genzel–Funktion.

Zero–filling

An das Ende des Interferogramms, d.h. den Bereich mit der größten Spiegelauslenkung werden Nullen angehängt. Dies hat einerseits eine Erhöhung der Punktdichte im Spektrum zur Folge (die aber keine weiteren Informationen liefert und lediglich einer Interpolation der Daten entspricht; die Auflösung wird nicht verändert), andererseits wird so bequem eine Punktzahl erreicht, die einer Potenz von 2 entspricht. In diesen Fällen lässt sich eine deutlich schnellere Fast–Fourier–Transformation (FFT) durchführen.

Phasenbestimmung

Wie bereits erwähnt könnte das Interferogramm auch beidseitig aufgenommen werden. In diesem Fall sollte es im optimalen Fall komplett symmetrisch sein. Dies ist allein aufgrund der nicht genau getroffenen *centerburst*–Position aber nicht der Fall. Eine entsprechende Korrektur erfolgt bei den einseitigen Interferogrammen durch den kleinen doppelseitigen Teil: Dieser wird ebenfalls apodisiert und zero–filled, anschließend Fourier–transformiert und ergibt aufgrund der fehlenden Symmetrie ein komplexes Spektrum². Aus dem komplexen Datenpunkt für jede Frequenz kann nun eine Phase berechnet werden, um die auch das einseitige Interferogramm korrigiert werden kann.

Fourier–Transformation und Phasenkorrektur

Das einseitige Interferogramm wird nun Fourier–transformiert und ergibt ein komplexes Spektrum, das aber mit Hilfe der im vorigen Schritt bestimmten Phasen

²Die Darstellung einer nichtsymmetrischen Funktion kann nicht allein durch eine Summe von Kosinussen erfolgen; die Sinusanteile ergeben den Imaginärteil des Spektrums.

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

komplett in den reellen Raum zurückgedreht werden kann. Damit ergibt sich ein Infrarotspektrum, das bei gewählter Auflösung dem wahren Spektrum am nächsten kommt.

Auflösung und Aliasing

Die Auflösung in Wellenzahlen wird durch den maximalen Verfahrweg des Spiegels gegeben: Nach dem Rayleigh-Kriterium muss zur Trennung zweier Banden, die d Wellenzahlen auseinander liegen, der Spiegelweg mindestens $1/d$ cm betragen, da erst ab dieser Strecke eine erneute konstruktive Überlagerung der Wellen beobachtet werden kann (vgl. Abb. 3.4 B).

Der erfasste Wellenzahlenbereich dagegen hängt von der Dichte der aufgenommenen Punkte ab: Nach dem Nyquist-Kriterium muss zur Detektion einer harmonischen Welle mit mindestens der doppelten Frequenz abgetastet werden, so dass sich für die maximal erfassbare Frequenz ν_{max} bei einem Abtastabstand des Spiegels von Δx ergibt:

$$\nu_{max} = \frac{1}{2} \times \nu_{abtast} = \frac{1}{2} \times \frac{1}{\Delta x}$$

Wird ein Spektrum mit einer zu geringen Maximalfrequenz abgetastet, so werden die Intensitäten der darüber hinausgehenden Frequenzen ν_i jeweils $\nu_i/2$ zugeordnet, so dass erhebliche Fehler im gemessenen Spektrum auftreten. Die Vorteile einer reduzierten Maximalfrequenz (wenige aufzunehmende Datenpunkte) können aber mit optischen Filtern erreicht werden.

3.2.3 Zeitauflösende Messungen

Bei modernen FTIR-Spektrometern, die über die entsprechenden Erweiterungen verfügen, gibt es zwei Möglichkeiten der zeitauflösenden Messung. Sowohl mit der *rapid-scan*- als auch mit der *step-scan*-Technik können Datensätze aufgenommen werden, die die Intensität am Detektor in Abhängigkeit der Spiegelstellung und der Zeit aufnehmen und sich in Spektren in Abhängigkeit der Zeit umrechnen lassen.

Rapid-Scan

In Abb. 3.5 ist im linken Teil die Vorgehensweise bei einer rapid-scan-Messung dargestellt: Der Spiegel fährt möglichst schnell zwischen seinen maximalen Auslenkungen hin und her und nimmt beim durchgezogenen Verlauf ein Spektrum auf. Wenn diese Bewegung mit dem Start des Funktionsablaufs der Probe (hier dargestellt durch einen Laserblitz) synchronisiert ist, erhält man in diesem Beispiel ein Interferogramm zu ungefähr jedem Drittel des Funktionszyklus. Die Zeitauflösung wird dabei durch die maximale Geschwindigkeit gegeben, mit der der Spiegel einen Durchlauf vollführen kann und beträgt bei modernen Geräten ungefähr 10 ms. Der

3.2 Fourier–Transform Infrarot–Spektroskopie

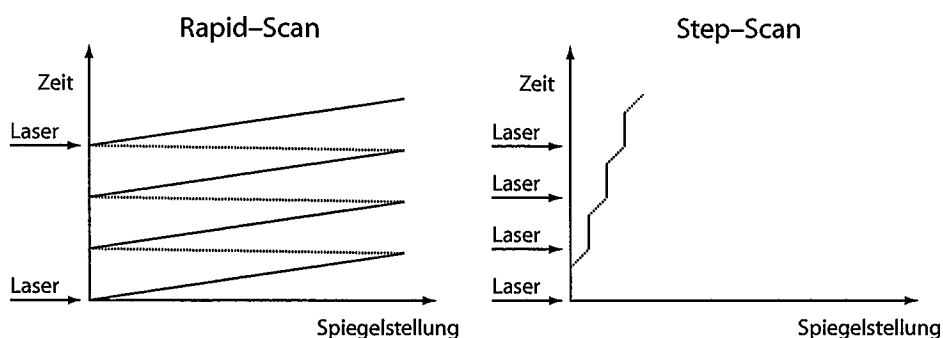


Abbildung 3.5 Vergleich der Techniken von rapid-scan und step-scan: Beim rapid-scan wird der Spiegel möglichst schnell zwischen seinen maximalen Auslenkungen hin und her bewegt, während die Probe ihren Funktionszyklus durchläuft. Mit der step-scan-Technik erfolgt die Datenaufnahme schrittweise an einzelnen Spiegelpositionen.

Vorteil dieser Technik ist, dass man unter Umständen mit *einem* Laserblitz einen kompletten zeitaufgelösten Datensatz aufnehmen kann. Wie die Abbildung aber zeigt, ist die Zeitinformation relativ unscharf: Ein Spektrum wird über eine Zeitspanne aufgenommen, die in der gleichen Größenordnung liegt, wie die Zeitspanne zwischen den Einzelmessungen, was unter Umständen zu Verfälschungen führen kann.

Step-Scan

Im rechten Teil der Abb. 3.5 ist die Technik des step-scans dargestellt: In diesem Fall wird der Spiegel nicht kontinuierlich bewegt, sondern nach und nach eine Position weitergeschoben. An jeder Spiegelstellung erfolgt der Start der Reaktion und der Detektor zeichnet die zeitliche Entwicklung des Signals auf. Unter Umständen kann dies mehrmals pro Position passieren, um das Signal zu mitteln, bevor der Spiegel wieder bewegt wird. Nach der Messung werden die Zeitspuren so aneinandergelegt, dass man für jede Zeit ein Interferogramm erhält, was dann in ein Spektrum umgerechnet wird.

Die Abbildung macht bereits deutlich, dass der benötigte Zeitaufwand gegenüber der rapid-scan-Technik deutlich höher ist, wenn man davon ausgeht, dass eine typische Anzahl von Spiegelstellungen im Bereich von 800 liegt. Allerdings ist die zeitliche Auflösung lediglich durch die Schnelligkeit des Detektors und der nachfolgenden Elektronik begrenzt, so dass Zeitaufösungen von bis zu 50 ns erreicht werden können. Eine wichtige Voraussetzung bei diesen Messungen ist allerdings eine Probe mit einem Funktionszyklus, der immer wieder ohne Änderungen durchlaufen wird³. Die Probleme einer Degradation der Probe können abgemildert

³ Allerdings gibt es neuere Entwicklungen, bei denen die Probe nach der Aufnahme einer Zeitspur

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

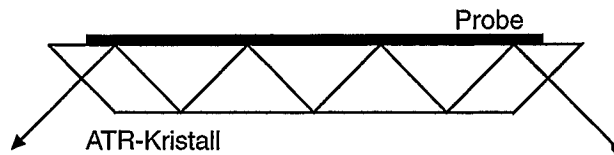


Abbildung 3.6 Beim ATR-Aufbau wird der Infrarotstrahl über einen senkrechten Einfall in einen Kristall eingekoppelt und führt dann an der Grenzfläche zum optisch dünneren Medium Totalreflexionen durch. Die evaneszierende Welle dringt dabei in die Probe ein und ermöglicht damit die Aufnahme eines Absorptionsspektrums.

werden, wenn die Anzahl der Einzelmessungen bei Verringerung der Zeitspurmitteilung an einer Position erhöht wird. Desweiteren ist es aufgrund der benötigten hohen Stabilität des Signals nicht möglich, zyklische Reaktionen, die sehr langsam in den Grundzustand zurückkehren, zu untersuchen⁴.

3.2.4 ATR-Spektroskopie

Mit Hilfe der sogenannten *attenuated total reflection (ATR)* –Spektroskopie lassen sich die bereits erwähnten Probleme der hohen Wasserabsorption bzw. schlechten Zugänglichkeit von Transmissionszellen lösen, wodurch sich diese Technik zu einer wertvollen Methode zur Untersuchung von biologischen Proben entwickelt hat [51, 52]. Der prinzipielle Aufbau solch einer ATR-Konfiguration ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Der Infrarotstrahl wird in einen möglichst nicht absorbierenden Kristall (ATR-Kristall oder *internal reflection element, IRE*) eingekoppelt und an einer Grenzfläche zum optisch dünneren Medium totalreflektiert. Elektrodynamisch ergibt sich an solch einer Grenzfläche eine ins angrenzende Medium *evaneszierende Welle*. Eine direkt auf dem Kristall liegende Probe kann damit erfasst werden und zeigt Absorptionsbanden im Infrarotspektrum. Die Eindringtiefe des Strahls liegt in der Größenordnung einer Wellenlänge, so daß bei diesem Aufbau der Einfluß der Wasserabsorption unabhängig von der Dicke der aufliegenden Wassermenge konstant und klein ist. Zudem ist die Probenzelle von oben problemlos zugänglich, so dass Parameter leicht verändert und die Auswirkungen direkt beobachtet werden können.

Allgemeines

Fällt ein Lichtstrahl auf die Grenzfläche zweier semiinfiniter Medien mit verschiedenen Brechungsindizes nach Abbildung 3.7, so gilt das Brechungsgesetz für den

gewechselt wird, so dass auch nichtzyklische Prozesse untersucht werden können [49].

⁴Mit Hilfe einer Art Probenwechsler lässt sich dieses Problem allerdings ebenfalls beseitigen [50].

3.2 Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie

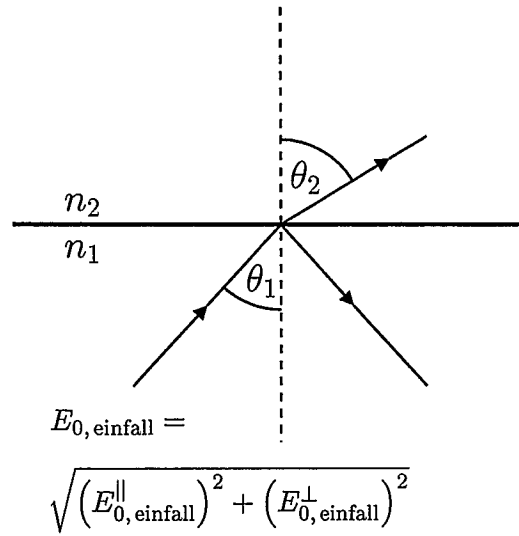


Abbildung 3.7 Brechung und Reflexion an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex. Die Feldamplitude E_0 des einfallenden Strahls kann aufgespalten werden in eine Komponente $E_0^{\parallel}$ parallel zur Einfallsebene und $E_0^{\perp}$ senkrecht zur Einfallsebene. Sie verhalten sich an der Grenzfläche unterschiedlich.

Winkel des einfallenden und des gebrochenen Strahls:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (3.3)$$

$$\Leftrightarrow \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_1} \equiv n_{21} \quad (3.4)$$

Für die Verhältnisse der Amplituden des reflektierten zum einfallenden Strahl ergeben sich die Fresnel-Formeln aus den Maxwell-Gleichungen:

$$r_{\perp} = \frac{E_{0,\text{refl.}}^{\perp}}{E_{0,\text{einfall}}^{\perp}} = -\frac{\sin(\theta_2 - \theta_1)}{\sin(\theta_2 + \theta_1)} \quad (3.5)$$

$$r_{\parallel} = \frac{E_{0,\text{refl.}}^{\parallel}}{E_{0,\text{einfall}}^{\parallel}} = \frac{\tan(\theta_2 - \theta_1)}{\tan(\theta_2 + \theta_1)} \quad , \quad (3.6)$$

jeweils für den Anteil des senkrecht bzw. parallel zur Einfallsebene polarisierten Lichts. Betrachtet man einen Einfall vom optisch dichteren Medium aus, d.h. $n_{21} < 1$, so ergibt sich bei $\theta_2 = \pi/2$ nach Gl. (3.4) ein kritischer Winkel:

$$\theta_1 = \theta_c = \arcsin n_{21} \quad , \quad (3.7)$$

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

ab dem an der Grenzfläche eine Totalreflexion stattfindet. Betrachtet man in diesem Bereich θ_2 formal als imaginär:

$$\cos \theta_2 = \sqrt{1 - \sin^2 \theta_2} \quad (3.8)$$

$$= i \frac{\sqrt{\sin^2 \theta_1 - n_{21}^2}}{n_{21}}, \quad (3.9)$$

und benutzt das Ergebnis in Gleichung (3.5) und (3.6), so erhält man die Amplitudenverhältnisse [53]:

$$r_{\perp} = \frac{\cos \theta - i \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}}{\cos \theta + i \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (3.10)$$

$$r_{\parallel} = \frac{n_{21}^2 \cos \theta - i \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}}{n_{21}^2 \cos \theta + i \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (3.11)$$

für den Fall der Totalreflexion, mit $\theta = \theta_1$. Für ein reelles n_{21} macht diese Rechnung wenig Sinn, da sie nur die Totalreflexion bestätigt: Der Betrag der Amplitudenverhältnisse ist in beiden Fällen 1, da jeweils komplex konjugierte Zahlen in Zähler und Nenner stehen.

Wenn aber, wie im Fall der ATR-Spektroskopie, das optisch dünnere Medium aus einer absorbierenden Probe besteht, so muss man einen imaginären Brechungsindex annehmen:

$$\hat{n}_2 = n_2(1 - i\kappa) \quad (3.12)$$

annehmen. Dann erhält man in den Fresnel-Formeln (3.10) und (3.11) einen von 1 verschiedenen, wellenlängenabhängigen Wert der Reflexion und somit den direkten Zusammenhang mit einem gemessenen Spektrum. Diese rein rechnerische Darstellung zeigt allerdings keinen physikalischen Einblick in die Vorgänge an solch einer Grenzfläche. Dazu ist es nötig, die elektromagnetischen Felder in dem Bereich zu betrachten:

Die ein- und ausfallende Welle überlagern sich und bilden eine stehende Welle, deren Knotenlage aber nicht — wie z.B. bei einer metallischen Reflexion — durch Verschwinden des E -Feldes an der Grenzfläche gegeben ist. Statt dessen ergeben sich dort folgende Werte für die Amplituden nach dem Koordinatensystem in Abb. 3.8 [53]:

$$E_{y0} = \frac{2 \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{21}^2}} \quad (3.13)$$

$$E_{x0} = 2 \frac{\sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2} \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (3.14)$$

3.2 Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie

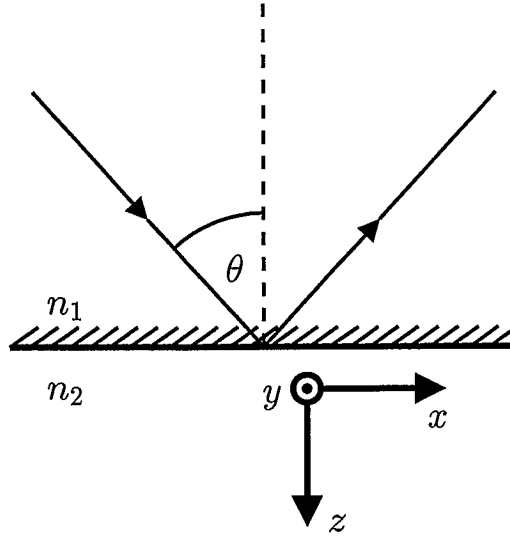


Abbildung 3.8 Das in den Rechnungen verwendete Koordinatensystem: Die senkrechte Feldkomponente (zur Einfallsebene) des einfallenden Strahls entspricht der y-Komponente, die parallele Komponente setzt sich aus x- und z-Komponente zusammen.

$$E_{z0} = \frac{2 \sin \theta \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2}} , \quad (3.15)$$

mit den Amplituden des einfallenden Strahls:

$$E_{0,\text{einfall}}^\perp = E_{0,\text{einfall}}^\parallel \equiv 1 \quad (3.16)$$

Der Feldverlauf im optisch dünneren Medium zeigt einen exponentiellen Abfall mit dem Abstand zur Grenzfläche, so daß sich mit der Kenntnis der Stetigkeitsbedingungen für die tangentialen Komponenten E_{x0} und E_{y0} , sowie des Sprungs in der Normalkomponente E_{z0} , qualitativ ein Verlauf der Gesamtamplitude E_0 nach Abbildung 3.9 ergibt. Diese Amplituden zeigen — wie bei stehenden Wellen üblich — einen zusätzlichen sinusförmigen Zeitverlauf, der über die Frequenz des einfallenden Strahls gegeben ist. Die evaneszierende Welle baut sich damit periodisch auf und wieder ab, wodurch Energie über die Grenzfläche hin und herfließt. Bei einem nicht absorbierenden optisch dünneren Medium ist allerdings das zeitliche Mittel des Energieflusses, des Poyntingvektors, gleich Null. Zeigt ein Medium aber Absorptionen bei einer bestimmten Wellenlänge, so entsteht ein Nettofluss der Energie über die Verbindungsstelle und resultiert in einer Absorptionsbande im Spektrum.

Die Größe der Absorption hängt von der Eindringtiefe d_p im Exponenten der

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

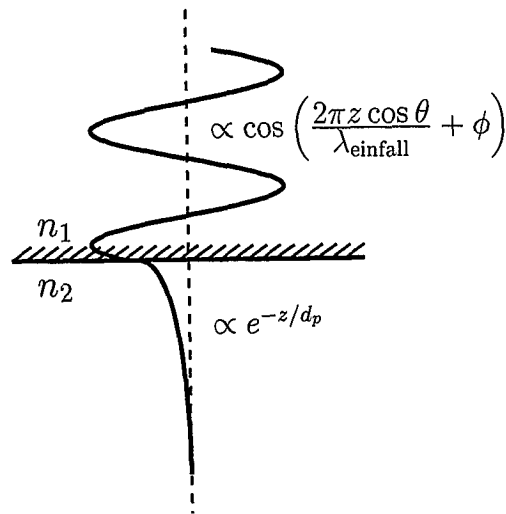


Abbildung 3.9 Qualitativer Feldverlauf bei Totalreflexion an einer Grenzfläche. Die stehende Welle im optisch dichteren Medium verläuft sinusförmig mit dem Abstand z zur Grenzfläche. Im dünneren Medium ergibt sich ein exponentieller Abfall.

evaneszierenden Welle ab (Abbildung 3.9). Es ergibt sich:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad , \quad (3.17)$$

wobei λ die Wellenlänge im Vakuum darstellt. Beispielsweise folgt für:

$$\begin{aligned} n_1 = n_{\text{Silizium}} &= 3.42 \\ n_2 = n_{\text{Wasser}} &= 1.33 \\ \theta &= 50^\circ \quad , \end{aligned}$$

eine Eindringtiefe von:

$$d_p \approx 0.4 \lambda$$

Über die Parameter Einfallswinkel und Verhältnis der Brechungsindices lässt sich im Experiment die Eindringtiefe regulieren: Die evaneszierende Welle erreicht viel Probenmaterial, wenn θ in die Nähe des kritischen Winkels θ_c kommt bzw. wenn n_{21} gegen 1 geht. Will man allerdings nur Vorgänge direkt an der Grenzfläche beobachten, so ist es günstig, den Einfallswinkel zu vergrößern und stark unterschiedliche Brechungsindices zu benutzen.

3.2 Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie

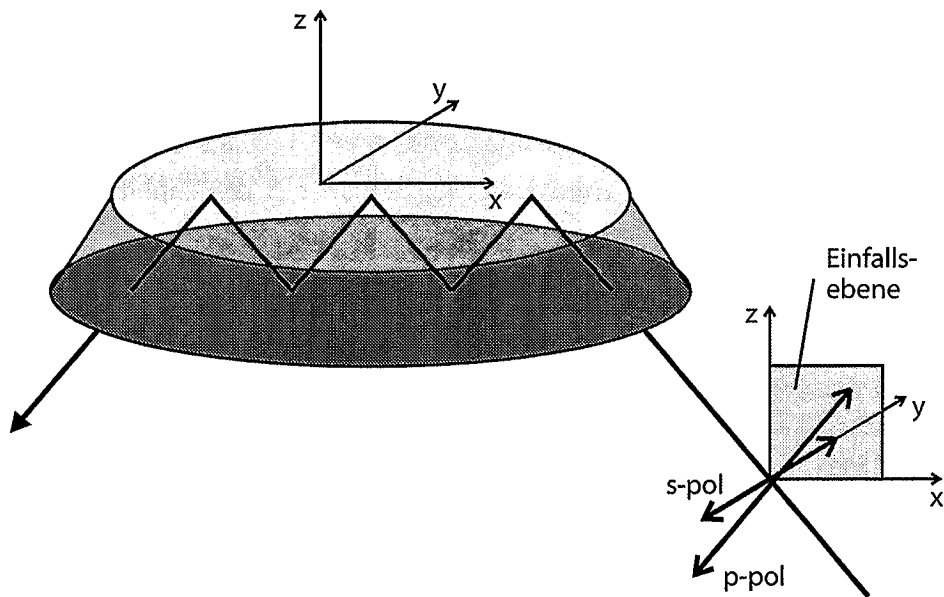


Abbildung 3.10 Koordinatensystem des in unserem Fall verwendeten ATR-Aufbaus. Der s - bzw. p -polarisierte Infrarotstrahl wird in die ATR-Scheibe eingekoppelt und sorgt in der evaneszierenden Welle für Feldkomponenten in y - bzw. x - und z -Richtung.

Lineardichroismus und Winkelberechnungen

Die Verwendung einer *ausgerichteten* Probe auf dem ATR-Kristall ermöglicht es, die Orientierung von Übergangsdipolmomenten mit p - und s -polarisiertem⁵ Licht zu untersuchen. Abb. 3.10 zeigt die in unserem Fall verwendete ATR-Scheibe, in die mit Hilfe eines Polarisators entweder p -polarisiertes oder s -polarisiertes Licht eingekoppelt wird. Mit Hilfe des eingezeichneten Koordinatensystems wird deutlich, dass ein Übergangsdipolmoment, was auf dem ATR-Kristall parallel zur z -Achse ausgerichtet ist, nur von p -polarisiertem Licht detektiert werden kann. Ein Übergangsdipolmoment parallel zur Kristalloberfläche wird dagegen sehr stark von s -polarisiertem Licht detektiert, zeigt aber auch Absorptionen in p -Richtung, da dieser Vektor ebenfalls eine Komponente in x -Richtung besitzt. Aus den quantitativen Verhältnissen kann bei beliebiger Orientierung auf einen Winkel geschlossen werden. Im folgenden wird nur der Fall der Probenausrichtung in einer Verteilung um die z -Achse berücksichtigt, die in unserem Fall die Anordnung der Purpurmembranfragmente parallel zur Kristalloberfläche beschreibt. Damit ist eine Winkelbestimmung auf den Winkel mit der z -Achse beschränkt.

Der benötigte Messwert ist das Verhältnis der Bandenabsorption von p - und

⁵ parallel und senkrecht zur Einfallsebene

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

s -polarisiertem Licht. Daraus wird das Dichroitische Verhältnis

$$R^{ATR} = \frac{A_p}{A_s} \quad (3.18)$$

berechnet, das nach [54] mit dem Ordnungsparameter S des Dipolmoments verknüpft ist:

$$R^{ATR} = \frac{E_x^2}{E_y^2} + \frac{E_z^2}{E_y^2} \left(1 + \frac{3S}{1-S} \right) \quad (3.19)$$

E_x , E_y und E_z entsprechen den elektrischen Feldstärken an der Grenzfläche und sind nach der *thick-film*-Theorie von HARRICK⁶ [53] gegeben durch die Gleichungen 3.13 bis 3.15. Einsetzen und Umformen nach S ergibt:

$$S = \frac{R(\sin^2 \theta + n_{21}^2 \sin^2 \theta - n_{21}^2) - 2 \sin^2 \theta + n_{21}^2}{R(\sin^2 \theta + n_{21}^2 \sin^2 \theta - n_{21}^2) + \sin^2 \theta + n_{21}^2} \quad (3.20)$$

Der damit bekannte Ordnungsparameter S eines Übergangsdipolmoments, der gegeben ist durch

$$S = \left\langle \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right\rangle \quad (3.21)$$

wobei α für alle Winkel steht, die dieses Übergangsdipolmoment auf dem Kristall einnimmt, hat den Vorteil, dass andere Orientierungseinflüsse herausgerechnet werden können: Die Verteilungsfunktion von α kann sich beispielsweise aus einer Verteilung des Übergangsdipolmoments im Protein (weil es mehrmals in unterschiedlichen Winkeln vorkommt), der Verteilung der Proteinachse zu einer Membranachse und der Verteilung dieser Membranachse zur Kristallnormalen zusammensetzen. Jeder Verteilung $C(\Gamma)$ in einem Winkel Γ lässt sich ein Ordnungsparameter nach

$$S_x = \int_0^\pi \frac{3 \cos^2 \Gamma - 1}{2} C(\Gamma) d\Gamma \quad (3.22)$$

zuordnen und das *gemessene* S ergibt sich zu

$$S_{mess} = S_1 \cdot S_2 \cdot S_3 \dots \quad (3.23)$$

Im Fall von Bacteriorhodopsin, das auf dem ATR-Kristall eingetrocknet wird, ergibt sich ein wichtiger Ordnungsparameter S_{ms} aus dem sogenannten *mosaic*

⁶ Bei dieser Theorie wird davon ausgegangen, dass der Brechungsindex des optisch dünneren Mediums im Rahmen der Eindringtiefe der evaneszierenden Welle konstant ist. Im vorigen Abschnitt bei der Ableitung der grundlegenden Gleichungen wurde stillschweigend davon ausgegangen. Je nach Probenpräparation kann aber auch eine *thin-film*-Theorie sinnvoll sein: Bei der Benutzung von Monolayern ist die Annahme eines dritten, aufliegenden Mediums mit erneut verändertem Brechungsindex sinnvoll.

3.2 Fourier–Transform Infrarot–Spektroskopie

spread, der Verteilung der Membrannormalen der einzelnen Fragmente bezüglich der z–Achse. Rechnet man diesen Parameter aus dem gemessenen heraus, so kann man in den meisten Fällen⁷ annehmen, dass ein Übergangsdipolmoment eine scharfe Verteilung hat, d.h. $C(\Gamma)$ wird in 3.22 durch eine δ –Funktion beschrieben und man kann direkt einen Winkel berechnen:

$$S = S_{\text{gesucht}} \cdot S_{ms} \quad (3.24)$$

$$= \frac{3 \cos^2 \Gamma_{\text{gesucht}} - 1}{2} \cdot S_{ms} \quad (3.25)$$

$$\Leftrightarrow \Gamma_{\text{gesucht}} = \arccos \sqrt{\frac{2S}{3S_{ms}} + \frac{1}{3}} \quad (3.26)$$

Damit ergibt sich der gewünschte Winkel zur Membrannormalen, der von Einflüssen des mosaic spread unabhängig ist. Zur Bestimmung der Größe des mosaic spread kann auf Literaturwerte unter gleichen Bedingungen zurückgegriffen werden.

⁷Dies gilt beispielsweise nicht für die Übergangsdipolmomente der Amid I Banden, die zwei zusätzliche Verteilungen benötigen: Die Richtung des Dipolmoments zur Helixachse und die Kippwinkel der Helices zur Membrannormalen [55, 56].

3 Grundlagen der Schwingungsspektroskopie an biologischen Proben

4 Messmethoden und Auswertung

4.1 Zeitauflösende FTIR-Spektroskopie

4.1.1 Spektrometerausstattung

Grundlage der zeitauflösenden Infrarotmessungen ist das FTIR-Spektrometer *IFS 66v* von *Bruker*, dessen schematischer Aufbau in Abb. 4.1 dargestellt ist. Mit Hilfe von KBr-Fenstern ist das Spektrometer in drei Kompartments aufgeteilt, die dafür sorgen, dass Probenkammer und restliches Spektrometer unabhängig voneinander evakuiert werden können (Betriebsdruck ca. 10 mbar). Im optimalen Fall lassen sich somit störende Absorptionen von Kohlendioxid oder Wasserdampf vollständig ausschließen¹. Zusätzlich trägt der geringe Atmosphärendruck in hohem Maße zur Signalstabilität bei: Sowohl Schwankungen in der Intensität der Lichtquelle durch Wärmeabfluss als auch Strahlversatz durch Konvektion der Luft werden vermieden [57].

Als Lichtquelle dient entweder ein Global² (IR) oder eine Halogenlampe (UV/VIS), zwischen denen mit Hilfe eines Spiegels, der die Strahlung zusätzlich parallelisiert, umgeschaltet werden kann. Ein Blendenrad ermöglicht einerseits die Regelung der Intensität bevor das Licht ins MICHELSON-Interferometer eingekoppelt wird, andererseits lässt sich der Winkel der schräg laufenden Strahlen einschränken und somit die spektrale Auflösung sichern. Das heraustretende, modulierte Licht wird durch die Probenkammer geleitet und trifft schließlich im Detektorkompartiment auf einen MCT-Detektor³ (IR) bzw. eine Siliziumphotodiode (UV/VIS). Die für die zeitauflösenden Messungen benutzte Kombination von MCT-Detektor und entsprechendem Vorverstärker besitzt eine Zeitauflösung von 5 μ s. Das resultierende Spannungssignal kann entweder ohne Filterkorrektur (DC-gekoppelt) oder über ein RC-Glied mit einer Abklingzeit von 100 ms (AC-gekoppelt) weiter verstärkt werden⁴. Schließlich wird das Signal von einem 16 bit Analog/Digital-Wandler mit einer maximalen Eingangsspannung von ± 1 V digitalisiert. Die Datenaufnah-

¹ Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde der Probenraum nicht evakuiert, sondern mit trockener Luft gespült. Genaueres zur Konfiguration des Probenraumes folgt in Abschnitt 4.1.2.

² Eine auf ca. 1500° C erhitzte Siliziumcarbidwendel

³ *Mercury-Cadmium-Tellurit*-Detektor: Ein photoconductiver Halbleiterdetektor, dessen Grundmaterial eine schmale Bandlücke besitzt, deren Größe zusätzlich durch die Zusammensetzung beeinflusst werden kann.

⁴ Die elektronische Verstärkung reicht von Faktor 2^0 bis Faktor 2^7 .

4 Messmethoden und Auswertung

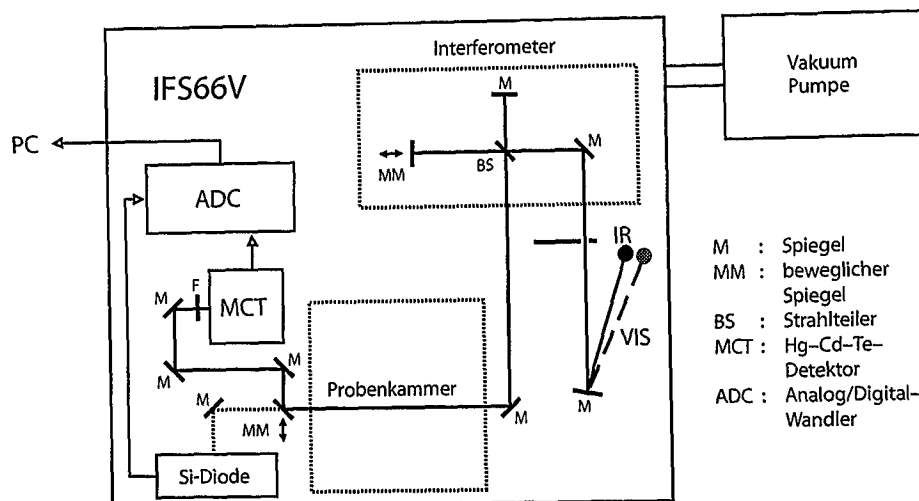


Abbildung 4.1 Der prinzipielle Aufbau des Infrarotspektrometers *Bruker IFS 66v*. Der IR-Strahl durchläuft drei Kompartimente, die unabhängig voneinander evakuiert werden können: Die Lichtquellen (Globar und Halogenlampe) bilden zusammen mit dem MICHELSON-Interferometer die erste Kammer, die durch KBr-Fenster vom Probenraum, der zweiten Kammer, getrennt ist. Das Detektorkompartiment enthält eine Si-Diode und einen MCT zur Detektion von Licht im Sichtbaren bzw. Infraroten.

me erfolgt dabei entweder mit einer festen Abtastrate zwischen 200 kHz und 8 kHz oder kann extern über einen TTL-Puls getriggert werden (siehe Abschnitt 4.1.4).

Die von *Bruker* zum Spektrometer gelieferte Software *Opus* ermöglicht die komfortable Steuerung des Gerätes sowie die Auswertung der aufgenommenen Daten. Während einer step-scan-Messung findet kein Datenaustausch zwischen Spektrometer und Steuerungs-PC statt. Die Anzahl der aufnehmbaren Datenpunkte pro Funktionszyklus ist somit von der Speichergröße des Analog/Digital-Wandlers abhängig. Die 2 Mbyte des genutzten Spektrometers ermöglichen beispielsweise Experimente mit der Aufnahme von 1000 Zeitpunkten bei 1000 Interferogrammpunkten. Um mit dieser Größenordnung an Spiegelstellungen auszukommen, wurde, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, bei allen Messungen ein Breitbandfilter der Firma OCLI⁵ verwendet. Dieser beschränkt das Schwarz-Körper-Spektrum des Globars auf den Bereich zwischen 950 cm^{-1} und 1950 cm^{-1} . Zusammen mit einer Standardauflösung von 4.5 cm^{-1} werden somit nur 844 Interferometerpunkte benötigt. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Möglichkeit, die Intensität des Messlichtes im interessanten Wellenlängenbereich zu erhöhen, ohne dass der Detektor in die Sättigung gerät.

⁵ Optical Coating Laboratory, Inc.

4.1 Zeitauflösende FTIR-Spektroskopie

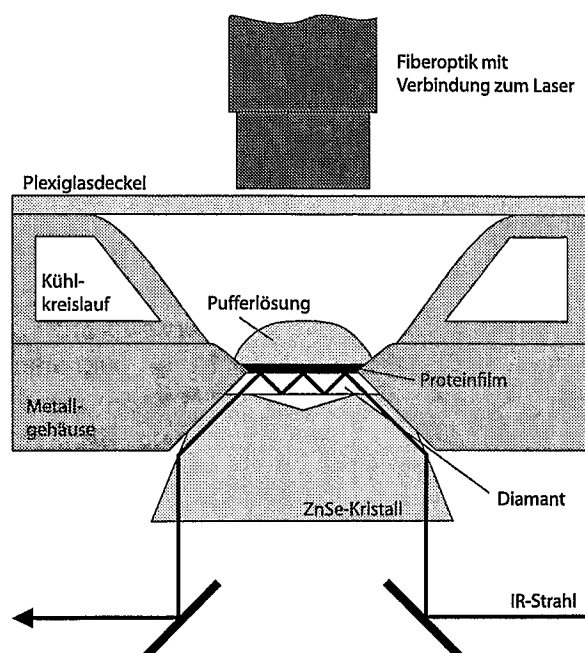


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Diamant-ATR-Zelle von *SensIR*. Der Infrarotstrahl wird über einen ZnSe-Kristall in die Diamantplatte eingekoppelt und symmetrisch wieder herausgeführt. Der Proteinfilm haftet auf der Oberfläche des Diamanten und ist durch einen Tropfen Pufferlösung vollständig hydratisiert. Der obere Teil mit Thermostatisierung und Plexiglasdeckel ist selbstgebaut und sorgt für stabile Bedingungen; die Faseroptik leitet den Laserblitz auf die Probe.

4.1.2 ATR-Aufbau

Die Vorteile der ATR-Spektroskopie gerade bei biologischen Proben wurden bereits in Abschnitt 3.2.4 angesprochen. Bei konventionellen ATR-Aufbauten werden diese Vorteile allerdings oft mit Nachteilen im Signal/Rausch-Verhältnis und vor allem mit einer erhöhten Probenmenge erkauft. Die horizontale ATR-Einheit von *Graseby Specac* beispielsweise besitzt einen ATR-Kristall mit einer Oberfläche von $70 \times 10 \text{ mm}^2$, die möglichst gleichmäßig mit Protein belegt werden muss. In unseren Messungen wurde deshalb z.B. bei BR eine Proteinmenge im Bereich von 100 bis $200 \mu\text{g}$ pro Experiment benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine neue ATR-Konfiguration der Firma *SensIR*⁶ auf ihre Eignung für zeitaufösende Messungen an biologischen Proben untersucht und schließlich standardmäßig benutzt. Eine schematische Darstellung des Aufbaus findet sich in Abb. 4.2. Zentrales Element ist eine Diamantscheibe, die als ATR-Element dient und eine Oberfläche mit einem Durchmesser von

⁶ *SensIR DuraSamplIR* mit 9 Reflektionen

4 Messmethoden und Auswertung

6 mm besitzt. Die Dicke von 0.25 mm sorgt bei einem mittleren Einfallswinkel des IR-Strahls von 47° für nominell 9 effektive Reflektionen an der Grenzfläche. Das Problem, den relativ divergenten Lichtstrahl in die sehr kleine Diamantscheibe einzukoppeln, wird durch einen ZnSe-Hilfskristall gelöst: Er leitet den IR-Strahl am äußeren Rand der Scheibe unter einem Winkel, bei dem normalerweise große Verluste durch Reflektion auftreten würden, in den Diamanten. Da aber die Brechungsindices von ZnSe und Diamant fast identisch sind, kann der Strahl nahezu ohne Brechung und Verluste in den Diamanten eindringen.

Nach der Reflektion an der Oberseite des ATR-Kristalls trifft der Strahl auf eine Diamant/Luft-Grenzfläche (Der ZnSe-Kristall ist dementsprechend in der Mitte ausgefräst) und eine verlustfreie Totalreflektion leitet den Strahl weiter. Erst am anderen Ende der Scheibe trifft er wieder das Diamant/ZnSe-Interface und wird symmetrisch in den Transmissionsstrahlengang des Spektrometers zurückgeführt.

Durch Bohrungen im Metallgehäuse der gelieferten Messzelle konnte eine Thermostatisierung auf der eigentlichen ATR-Scheibe angebracht werden. Ein Thermostat (*Julabo*) pumpt kontinuierlich Kühlwasser durch den metallischen Ring, der über Wärmekontaktpaste mit dem Metallgehäuse des Diamanten verbunden ist. Zusammen mit der sehr guten Wärmeleitfähigkeit von Diamant erreicht man somit eine ausgezeichnete Temperaturstabilität.

Ein Plexiglasdeckel mit Dichtring, der auf diesem Metallring verschraubt werden kann, schließt das Probenvolumen und die Atmosphäre darüber von der Umgebung ab. Diese kann somit mit trockener Luft gespült werden, ohne dass der Flüssigkeitstropfen der Probe verdampft. Eine Evakuierung des Probenraumes sollte unter diesen Bedingungen ebenfalls möglich sein, wurde aber mit Rücksicht auf die vereinfachte Handhabung beim Probenwechsel und aufgrund der ausreichenden Signalstabilität unterlassen.

Setzt man gleiche effektive Weglängen des IR-Strahles voraus⁷, so ist die benötigte Probenmenge allein von der Oberfläche des ATR-Kristalls abhängig. Im Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Aufbauten (*Graseby Specac* und *SensIR*), die ungefähr gleiche Proteinsignale liefern, liegt das Verhältnis der Oberflächen bei 1 : 14, was genau der Reduktion in benötigter Proteinmenge entspricht. Die Verwendung der *SensIR*-Zelle hat somit gerade bei „wertvollen“ Proteinen große Vorteile. Hinzu kommt die deutlich vereinfachte Probenpräparation, die im folgenden Abschnitt 4.1.3 genauer dargestellt wird und im Wesentlichen auf der extremen Härte des Diamanten beruht. ZnSe-Kristalle beispielsweise werden durch grobes Abwischen der Probe und die damit verbundenen Kratzer sehr schnell unbrauchbar.

Die Verwendung von Diamant als Material von ATR-Kristallen hat aber nicht nur Vorteile. Am Schwerwiegendsten sind die Einschränkungen im Bereich der nutzbaren Wellenlängen. Abb. 4.3 zeigt das Einkanalspektrum zweier ATR-Auf-

⁷ Zur Definition der effektiven Weglänge siehe Abschnitt 3.2.4

4.1 Zeitauflösende FTIR-Spektroskopie

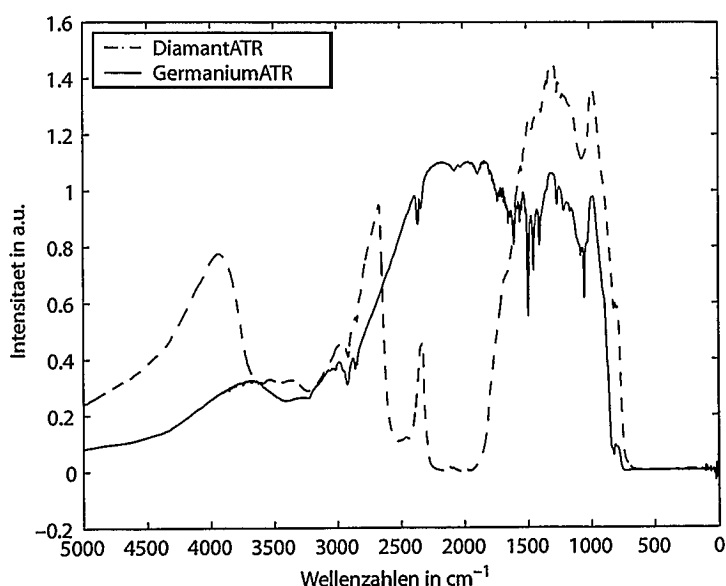


Abbildung 4.3 Einkanalspektren der Germanium-ATR- und der Diamant-ATR-Zelle mit identischer Intensität der IR-Quelle. Der für die Messungen an Proteinen wichtige *finger-print*-Bereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} ist bei beiden Aufbauten durchlässig. Allerdings sorgt die scharfe Flanke des Diamanten hin zum Bereich um 2000 cm^{-1} , wo Diamant keine Transmission zeigt, für eine unter Umständen geringere Intensität im Wellenzahlenbereich oberhalb von 1700 cm^{-1} .

bauten, die einerseits auf einem Ge-Kristall andererseits auf Diamant als Reflektionsselement beruhen. Germanium mit seinem breiten Transmissionsbereich bis über 4000 cm^{-1} deckt die wichtigen Frequenzen zwischen 1000 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} offensichtlich ab. Im Gegensatz dazu zeigt Diamant aber um 2000 cm^{-1} einen Bereich sehr starker Absorption⁸ dessen entsprechende Flanke in die wichtigen Frequenzen um 1700 cm^{-1} hereinragt, so dass hier die Photonenintensität unter Umständen geringer ist als bei dem Germaniumaufbau. Dies hat somit einen Abfall des Signal/Rausch-Verhältnisses in diesem Bereich zur Folge.

Der Probenraum des Spektrometers ist groß genug, um zusätzlich zu der Diamant-ATR-Zelle einen Polarisator hinter dem Aufbau zu platzieren. Dieser von *Bruker* gelieferte Gitterpolarisator aus KRS-5⁹ lässt sich per Softwarekommando einerseits in den Strahl hinein- und herausfahren, andererseits in 1° -Schritten

⁸ Der verwendete Diamant wird durch CVD (chemical vapour deposition) hergestellt. Bei der Absorption um 2000 cm^{-1} handelt es sich aber nicht um die Absorption durch Verunreinigungen während des Herstellungsprozesses, sondern um 2-Phononen-Anregungen des Diamantgitters [58]. Man findet die Absorption auch bei natürlichen Diamanten.

⁹ Eine Mischung aus Thalliumbromid und -iodid

4 Messmethoden und Auswertung

drehen, um die verschiedenen Polarisationsrichtungen des IR-Strahls auszuwählen.

4.1.3 Probenpräparation

Die Vorteile der ATR-Spektroskopie bei biologischen Proben liegen in der inhärent kleinen effektiven Weglänge des IR-Lichts durch das Probenvolumen. Zur Detektion des dementsprechend kleinen Proteinsignals muss somit das Verhältnis zwischen Protein und Wasser möglichst groß sein. Dies ist in Lösung nur schwer zu erreichen, so dass bei allen in ATR-Konfiguration gemessenen Membranproteinen die Anreicherung des Proteins an der Oberfläche durch Eintrocknen genutzt wurde. Im Falle von BR und HR wurde also ein 5 µl Tropfen Purpurmembranlösung (2 mg/ml) auf den Diamanten gegeben und anschließend unter Stickstoffstrom eingetrocknet. Der entstandene Film bleibt beim anschließenden Rehydratisieren auf der Oberfläche des Kristalls haften, falls die Lösung eine ausreichende Salzkonzentration besitzt. Standardmäßig wurde eine 1 M KCl-Lösung mit einem 10 mM Phosphatpuffer bei pH 7.2 benutzt. Im Infrarotspektrum kann man beobachten, wie während dieses Vorgangs das Wasser wieder in die Schicht hineinströmt, der Film anfängt zu schwellen und nach ca. einer Stunde ein stabiler Zustand erreicht wird [59].

Zeitgleich mit diesem Schwellvorgang lässt sich beobachten, wie Absorptionen von Wasserdampf und Kohlendioxid aus dem Spektrum verschwinden, wenn der Probenraum mit trockener Luft gespült wird, bis schließlich ein stabiler Zustand erreicht wird. Im Wesentlichen beschränkt sich die zeitliche Veränderung der IR-Signale auf breitbandige Veränderungen wie baseline-drifts oder Verkipnungen, die auf Schwankungen des Detektorsignals zurückzuführen sind. Insbesondere Temperaturschwankungen wie sie durch das Nachfüllen der Stickstoffkühlung unvermeidlich sind, verursachen die größten Störungen im Spektrum [60, 61].

Nach der Messung lässt sich die Probe einfach vom Kristall abwischen. Da der Diamant nicht ausbaubar ist, muss zur Entfernung der Protein/Lipid-Reste unter dem Rand der Kristallhalterung mit Ethanol und Wasser unter leichtem mechanischem Druck gereinigt werden. Nach dieser Prozedur sind im Spektrum keine Proteinbanden mehr erkennbar.

Vergleicht man diese Probenpräparation, die in ca. einer Stunde durchgeführt werden kann, mit derjenigen für den *Graseby Specac* Aufbau [59], so erkennt man den enormen Zeitvorteil: Um ein Zerkratzen des ATR-Kristalls zu verhindern und eine mehr oder weniger homogene Proteinschicht auf dem Kristall zu erreichen, wurde der Proteinfilm auf den ausgebauten und speziell präparierten Kristall aufgebracht und über Nacht zur besseren Adhäsion gelagert. Trotz äußerster Vorsicht kann auf Dauer ein Verkratzen und eine Degradation der Kristalloberfläche nicht verhindert werden.

4.1.4 Probenanregung und Triggerung

Voraussetzung für die zeitauflösenden Messungen an Proteinen ist die Möglichkeit, den Funktionszyklus des Proteins synchronisiert zu starten. Bei den lichtgetriebenen Ionenpumpen BR und HR ist dies relativ einfach über einen kurzen Laserblitz erreichbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Nd:YAG Laser *GCR 12S* von *Spectra Physics* zur Erzeugung eines 1064 nm Pulses benutzt, welcher dann mit Hilfe eines KDP-Kristalls¹⁰ frequenzverdoppelt wurde. Der resultierende ca. 10 ns lange Puls mit einer Wellenlänge von 532 nm etwas unterhalb des Absorptionsmaximums des BR- oder HR-Grundzustandes kann einerseits genügend Proteine anregen, verhindert aber andererseits das Zurückblitzen von Proteinen, die sich bereits im K-Intermediat (Maximum der Absorption bei 590 nm) befinden. Bei einer Pulslänge von 10 ns ist dies ein nicht zu vernachlässigender Prozentsatz.

Hinter dem Frequenzverdoppler und nachdem die Grundfrequenz herausgefiltert wurde, wird der Laserpuls in einen Lichtleiter eingekoppelt und damit bequem auf die Probe geführt (siehe Abb. 4.2). Neben dem Vorteil der einfachen Handhabung zerstört der Lichtleiter auch die ungewollte Polarisierung des Laserpulses sowie das typische Gaussprofil. Eine gleichmäßige Ausleuchtung der Probe ist somit gewährleistet.

Mit Hilfe eines Pyroelements kann die Pulsenergie gemessen und entsprechend geregelt werden. Für die Messungen an BR und HR wurden Pulsenergien von ca. 1 mJ eingestellt, was einer Intensität von 1 bis 2 mJ/cm² entspricht. Die Schwankungen in der Anregungsenergie und damit die Schwankungen im Umsatz der angeregten Proteine liegen unter 10 %, falls der Laser bereits einige Zeit mit konstanter Frequenz läuft. Zu große Umsatzschwankungen können unter Umständen erhebliche Störungen im Spektrum verursachen [61]: Falls die entsprechenden Schwankungen im Signal durch Mittelungen bei der gleichen Spiegelposition *nicht* ausgeglichen werden, so erhält man starkes Rauschen in den Interferogrammen und damit auch in den Spektren.

Prinzipiell müssen bei den zeitauflösenden Messungen der Anregungspuls und die Datenaufnahme am Spektrometer miteinander synchronisiert sein. Im einfachsten Fall wurde folgendermaßen vorgegangen: Das Spektrometer ist der *master*-Trigger und gibt einen TTL-Puls an den Laser, wenn der Funktionszyklus des Proteins gestartet werden soll. Während das Spektrometer mit der Datenaufnahme in äquidistanten Zeitschritten, z.B. alle 5 μ s, beginnt, wird das TTL-Signal als Lampentrigger des Lasers benutzt. Die Lampen pumpen den Nd:YAG-Kristall, sorgen für die Besetzungsinversion und nach einer am Laser eingestellten Zeitspanne öffnet der Q-switch des Lasers, um den eigentlichen Lichtblitz herauszugeben. Die Zeitspanne zwischen Lampentrigger und Öffnung des Q-switch (typischerweise 140 μ s), während der die Datenaufnahme bereits beginnt, wird für die Aufnahme

¹⁰ KDP steht für Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 . Dieses Material zeigt starke nichtlineare Effekte, die z.B. zur Frequenzverdopplung genutzt werden können.

4 Messmethoden und Auswertung

der Referenzspektren genutzt ($140\text{ }\mu\text{s}$ ergeben somit 28 Referenzspektren). Nach dem Zyklus wird entweder zur Mittelung ein neuer initiiert, oder der Spiegel des MICHELSON-Interferometers eine Stellung weiter gefahren und dort mit dem nächsten Zyklus begonnen.

Der Nachteil dieser Konfiguration liegt darin, dass das Spektrometer als *master*-Trigger nicht in der Lage ist, die Abtastintervalle des Analog/Digital-Wandlers zu variieren. Eine Rate von 200 kHz kann somit nur alle $5\text{ }\mu\text{s}$ einen Wert aufnehmen. Da allerdings der Speicher des Spektrometers beschränkt ist auf ca. 1000 Zeitschritte (Abschnitt 4.1.1), lässt sich somit bei hoher Zeitauflösung ein Zeitbereich von $5\text{ }\mu\text{s}$ bis 5 ms erfassen. Die Aufnahme von Spektren *nach* 5 ms erfordert somit eine zweite Messung mit langsamerer Abtaste (z.B. $100\text{ }\mu\text{s}$) und anschließend „Zusammensetzen“ der beiden Daten.

Prinzipiell ist dies sinnvoll, da die Datenaufnahme mit einer konstanten Abtaste über eine lange Zeitspanne keine zusätzlichen Informationen liefert: Intermediate, die mit einer Zeitkonstante zerfallen, die schneller als diejenige ihres Aufbaus ist, können auch mit einer hohen Abtaste nicht detektiert werden: Die Anzahl der Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt in diesem Zustand ist zu gering. Insofern wäre eine dynamische Anpassung der Messintervalle während des Zyklus optimal, um mit *einer* Messung den gesamten Ablauf zu erfassen. Dies wurde folgendermaßen realisiert: Wie oben erwähnt kann das Spektrometer bei *interner* Triggerung nur äquidistant abtasten. Mit Hilfe *externer* Triggerung (so genannter *sampling*-Trigger) lassen sich beliebige Abtastintervalle bis zu einem Minimum von $7\text{ }\mu\text{s}$ realisieren. Als *master*-Trigger wurde bei diesen Messungen ein programmierbarer Frequenzgenerator (*Wavetek model 39*) genutzt. Dieser ist in der Lage, eine programmierte Wellenform mit einer Frequenz von ca. 285 kHz auszugeben, die TTL-Pulse mit anfangs äquidistanten, später immer größer werdenden Abständen (*quasi-logarithmisch*) auszugeben. Abb. 4.4 gibt einen Überblick der benutzten Methoden und die dementsprechend erfassten Zeitbereiche. Man erkennt in der halblogarithmischen Darstellung, dass die externe Triggerung bei späten Zeitbereichen durch eine Gerade dargestellt wird.

Gleichzeitig mit dem Beginn der Wellenform gibt der Frequenzgenerator einen TTL-Puls als Experiment-Trigger an das Spektrometer und an den Laser. Das Spektrometer wartet damit auf die *sampling*-Pulse, der Laser startet die Blitzlampen und löst eigenständig $140\text{ }\mu\text{s}$ später den Q-switch aus. Abhängig von der Dauer des Funktionszyklus kann die Anzahl der *sampling*-Trigger verkürzt oder verlängert werden, sowie die Repetitionsrate des Experiment-Triggers angepasst werden.

4.1.5 AC-gekoppelte Messungen

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, erfolgt die Digitalisierung des IR-Dektorsignals mit einem 16 bit Analog/Digital-Wandler. Bei step-scan-Messungen

4.1 Zeitauflösende FTIR-Spektroskopie

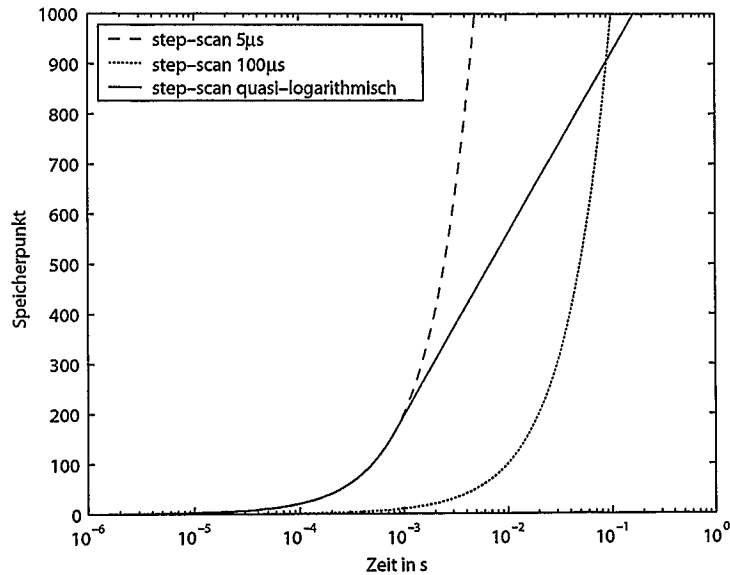


Abbildung 4.4 Abgedeckte Zeitbereiche bei verschiedenen Messmethoden: Werden die 1000 Messpunkte mit einer $5\mu\text{s}$ -Messung gefüllt, so ist eine zweite Messung mit $100\mu\text{s}$ -Abständen notwendig. Die Messung mit der quasi-logarithmischen Zeitachse überdeckt dagegen den gesamten Zeitbereich ohne Verluste in der Zeitauflösung zu frühen Zeitpunkten.

stellt sich die Frage, warum eine DC-Kopplung des Signals notwendig ist, wenn am Schluss doch *Differenzspektren* berechnet werden, die nur *Änderungen* in Bezug zum Grundzustand darstellen. Die direkte Aufzeichnung von *Signaländerungen* über das AC-Signal sollte somit den großen Vorteil haben, dass diese Änderungen so weit verstärkt werden könnten, dass sie mit 16 bit abgetastet werden. Geht man davon aus, dass die induzierten Änderungen in der Probe im Bereich von 1 % des Grundsignals liegen, so ließe sich die elektronische Verstärkung um den Faktor 100 vergrößern, was eine erhebliche Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses zur Folge hätte. Zusätzlich sollte die Detektion von Signalen, die bei DC-Kopplung unter der 1 bit-Schwelle liegen, durch die AC-Kopplung überhaupt erst möglich werden.

Die Gründe für die standardmäßig benutzte DC-Kopplung bei step-scan-Messungen trotz der offensichtlichen Vorteile der AC-Kopplung sind folgende:

- Ein Differenzspektrum bezieht das gemessene Einkanalspektrum auf das Einkanalspektrum des Grundzustandes, ist also begrifflich eher ein *Verhältnisspektrum* als ein *Differenzspektrum*: Die Änderung einer großen Bande muss entsprechend größer sein als die Änderung einer kleinen Bande, um ein gleich hohes Signal im Differenzspektrum zu erzeugen. Eine AC-gekoppelte Messung liefert aber allein den *Unterschied* zwischen den Einkanalspektren, der

4 Messmethoden und Auswertung

somit nicht ausreicht, um ein Differenzspektrum zu berechnen.

- Bei der Umrechnung der aufgenommenen Interferogramme in Einkanalspektren wird zur Berechnung der Phase nach Abschnitt 3.2.2 die Mertz-Methode benutzt. Eine Grundvoraussetzung zur Anwendung der Methode ist allerdings, dass das aufgenommene Interferogramm zu einem Einkanalspektrum gehört, d.h. alle Messwerte positiv sind. Dies bestimmt nämlich das Vorzeichen des Phasenwinkels. Da im Falle von Differenzspektren diese Voraussetzung nicht erfüllt ist, kann die Mertz-Methode nicht unkorrigiert angewandt werden.
- Die AC-Kopplung wird durch das Hinzuschalten eines RC-Gliedes erreicht und hat somit zur Folge, dass die Bandbreite des Durchlasssignals beschränkt wird. Es wirkt wie ein Hochpass, dessen Grenzfrequenz durch die Kombination von Widerstand R und Kondensator C gegeben ist. Unglücklicherweise bestimmen zwei gegenläufige Parameter die richtige Wahl dieser Kombination: Auf der einen Seite will man eine möglichst niedrige Grenzfrequenz, um auch langsame Änderungen im Proteinsignal messen zu können. Andererseits ist man darauf angewiesen, dass beim nächsten Start des Funktionszyklus das Signal wieder auf Null zurückgegangen ist, was genau dann sehr lange dauern kann, wenn der Spiegel eine Position weiter gefahren wurde. In diesem Fall ist die Modulation sehr viel größer als diejenige des Funktionszyklus.

Die Wartezeit nach Verschieben des Spiegels kann man aber auch nicht beliebig verlängern, da dies unter Umständen die Messdauer stark verlängert und Probleme mit der Stabilität des Messsignals über große Zeitspannen zur Folge hat. In den meisten Fällen ist also eine Beeinflussung des Signals gerade bei langsamen Veränderungen unvermeidbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur im Falle von Halorhodopsin auf AC-gekoppelte Messungen zurückgegriffen, da die Proteinsignale bei DC-Kopplung teilweise offenbar unter der 1 bit-Grenze lagen. In diesem Fall sind bessere Signal/Rausch-Verhältnisse auch durch verstärkte Mittelung kaum erreichbar. Die AC-Kopplung wurde durch die Benutzung eines Hochpasses im Vorverstärker des Detektors mit einer Grenzfrequenz von 1.6 Hz erreicht.

Um die oben genannten Probleme der AC-Kopplung zu lösen, wurde vor der eigentlichen zeitauflösenden step-scan-Messung ein DC-Spektrum des Grundzustands aufgenommen. Dieses Spektrum wird bei der Auswertung benutzt, um einerseits „echte“ Differenzspektren berechnen zu können, andererseits, um eine Phase zu erhalten, mit der man auch die zeitaufgelösten Interferogramme korrigieren kann. Diese Methode, mit der man die beiden ersten Probleme lösen kann, setzt eine ausreichende Stabilität der Apparatur voraus: Die mit der ersten Messung festgestellte Phase muss z.B. auf ein Interferogramm passen, was teilweise 2 Stunden später gemessen wurde. Desweiteren ist eine Kompatibilität zwischen der

4.1 Zeitauflösende FTIR-Spektroskopie

Tabelle 4.1 Hardwarelösungen bei GERWERT *et. al.* und SIEBERT *et. al.* nach [63, 64, 62] zur Erweiterung von *Bruker* FTIR-Spektrometern.

	SIEBERT	GERWERT
DC-Karte	A/D-Wandler	A/D-Wandler
Auflösung	13 bit	12 bit
Transientenrekorder 1	PAD-82	PAD-82
Kopplung	DC mit offset-Korrektur	AC
maximale sampling Rate	200 MHz	200 MHz
Auflösung	8 bit	8 bit
quasilogarithmische Zeitachse möglich	nein	nein
Transientenrekorder 2	PAD-52	AD-WIN 8
Kopplung	DC mit offset-Korrektur	DC mit offset-Korrektur
max. sampling Rate	50 MHz	200 kHz
Auflösung	8 bit	12 bit
quasilogarithmische Zeitachse möglich	ja	ja

Phasenmessung und der zeitaufgelösten notwendig, die nur erreicht werden kann, wenn beides step-scan-Messungen sind. Die ersten Versuche mit einem Grundzustandsspektrum aus einer rapid-scan-Mittelung und der entsprechenden Phase scheiterten.

Alle Testmessungen — einfacherweise dadurch realisiert, dass zwei Phasenmessungen vor und nach einer zeitaufgelösten Messung durchgeführt und verglichen wurden — konnten die Stabilität der Apparatur bestätigen und die Vorgehensweise rechtfertigen. Die gesamte Prozedur einer AC-gekoppelten Messung ist im Anhang A.1 auf Seite 109 ausführlich dargestellt.

4.1.6 Die Messmethode im Vergleich

In der Literatur finden sich mehrere Alternativen zu den im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Änderungen am Standardsetup des Spektrometers. Vergleichbare Aufbauten findet man bei GERWERT *et. al.* [62] und SIEBERT *et. al.* [63, 64], deren Apparaturen im folgenden kurz dargestellt werden.

Zentrales Problem des Standardsetups des Spektrometers ist einerseits die DC-Kopplung des Messsignals, andererseits die lineare Zeitbasis mit beschränktem Speicher zur Aufnahme von Datenpunkten. Nach Tabelle 4.1 lösen die Aufbauten der obigen Gruppen diese Probleme durch die Benutzung von jeweils zwei zusätzlichen, externen Transientenrekordern und einem zusätzlichen Analog/Digital-Wandler. Letzterer wird zur Messung des statischen DC-Wertes bei einer Spiegelposition benutzt und liefert die Information über das Grundzustandsinterfero-

4 Messmethoden und Auswertung

gramm. Somit können beide Transientenrekorder AC-gekoppelt betrieben werden. Dabei wird entweder eine echte AC-Kopplung über ein RC-Glied benutzt, oder eine offset-Kompensation geschaltet: Nachdem der bewegliche Spiegel des Interferometers um eine Position weitergefahren wurde, wird der neue DC-Level mit dem A/D-Wandler gemessen und dieser Wert auf der Signalleitung zum Transientenrekorder elektronisch abgezogen. Obwohl damit das Grundsignal auf Null liegt, werden langsame Frequenzen trotzdem durchgelassen; man spricht von einer quasi-DC-Kopplung.

Die PAD-82-Karte wird bei beiden Aufbauten zur Messung mit hoher Zeitauflösung im Bereich bis ca. 20 μ s genutzt; parallel wird das Signal in den zweiten Transientenrekorder eingespeist und mit verringerter sampling-Rate zur Aufnahme der langsameren Kinetiken benutzt. Sowohl PAD-52 als auch AD-WIN 8 können zusätzlich quasilogarithmisch abtasten.

Beide Aufbauten sind somit in der Lage, einen extrem großen zeitlichen Bereich mit einer Messung zu erfassen, wobei die offset-korrigierte DC-Kopplung sicherstellt, dass einerseits der Signalverlauf nicht verfälscht wird, andererseits das Signal den dynamischen Bereich des Transientenrekorders auch ausnutzt. Allerdings ist dies bei den benutzten 8 bzw. 12 bit Karten auch notwendig: Bei nicht korrigierter DC-Kopplung wären die Änderungen im Signal sonst kaum detektierbar.

Desweiteren stellt sich die Frage, ob die gleichzeitige Messung von schnellen Reaktionen im Nanosekundenbereich und langsameren in Millisekunden überhaupt erstrebenswert ist: Schnelle Kinetiken erfordern sowohl einen *photovoltaischen* MCT-Detektor mit schlechterem Signal/Rausch-Verhältnis als auch eine schnellere, rauschstärkere Verstärkerelektronik. Eine Trennung der Datenaufnahme in zwei Messungen ist somit unter Umständen von Vorteil.

Der im Rahmen dieser Arbeit benutzte und entwickelte Aufbau arbeitet dagegen standardmäßig mit einem photokonduktivem MCT-Detektor und entsprechend langsamerer Elektronik. Der benutzte 16 bit Transientenrekorder erlaubt hier in den meisten Fällen eine DC-Kopplung auch bei kleinen Signalen und deckt mit einem quasilogarithmischen sampling den gesamten messbaren Zeitbereich ab. Wie beschrieben kann — bei extrem kleinen Signalen — auf eine AC-Kopplung zurückgegriffen werden, die bei nicht zu späten Zeiten unverfälschte Ergebnisse liefert.

Im Vergleich zum finanziellen und technischen Aufwand der Lösungen von SIEBERT und GERWERT zeigt sich also, dass mit lediglich einem Funktionsgenerator und einem geschickten Messprotokoll zur AC-Kopplung zumindest für nicht zu hohe Zeitaufösungen eine vergleichbare Lösung realisierbar ist.

4.1.7 Datenanalyse

Step-scan-Messungen

Die Bearbeitungsmöglichkeiten der zeitaufgelösten Messungen mit Hilfe der *Opus*-Software sind sehr beschränkt, weshalb die Analyse der Daten im Wesentlichen auf einem *Linux*-PC mit der Mathematiksoftware *Matlab* der Fa. *The Mathworks* durchgeführt wird.

Die Daten einer zeitaufgelösten Messung werden von der Spektrometersoftware in einem binären *file* von 4Mbyte Größe abgelegt. Diese Datei wird auf den PC übertragen, und die Messdaten mit Hilfe eines *Matlab*-Programms aus diesem *file* extrahiert und in einer Matrix abgelegt. Die Spalten der Matrix enthalten die Spektren zu den verschiedenen Zeitpunkten, so dass typischerweise eine 844×1000 -Matrix die Rohdaten enthält. Stehen mehrere identische Messungen zur Mittelung zur Verfügung, so werden diese nacheinander eingelesen und direkt — unter Umständen gewichtet — coaddiert.

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei den aufgenommenen Spektren um Einkanalspektren, so dass die Differenzspektren erst berechnet werden müssen. Die Triggerung des Laserblitzes erfolgt bei den Messungen so, dass einige Spektren vor dem Blitz aufgenommen werden und als Referenz dienen. Durch Ausprobieren lässt sich die richtige Anzahl an Referenzspektren am einfachsten bestimmen: Es wird mit einer minimalen Anzahl angefangen und in den Zeitverläufen (meist anhand der SVD-Analyse; s.u.) entschieden, wieviele Spektren zusätzlich noch vor dem Blitz aufgenommen wurden. Die Gesamtzahl wird dann zu einem Referenzspektrum gemittelt und das Programm berechnet nach

$$\text{Diff}_i = \log_{10} \frac{I_{\text{ref}}}{I_i} \quad (4.1)$$

das i -te Spektrum aus dem logarithmischen Verhältnis des i -ten Einkanalspektrums und des gemittelten Referenzspektrums.

Wie bereits in Abschnitt 4.1.4 dargestellt ist bei der Detektion von Reaktionskinetiken über große Zeitbereiche eine logarithmische Darstellung der Zeitachse sinnvoll. Aus diesem Grund wird bei Messungen mit einem festen Abtastintervall nach der Berechnung der Differenzspektren eine Mittelung auf der Zeitskala vorgenommen, die im hinteren Zeitbereich Datenpunkte zusammenfasst, um dies zu erreichen. Dabei werden zum Schluss bis zu 12 Zeitpunkte zusammengefasst. Genauere Erläuterungen zur Vorgehensweise finden sich in Anhang A.2.

Das Programm, welches zur Zusammenfassung der äquidistanten Datenpunkte genutzt wird, ermöglicht ebenfalls die Mittelung der mit quasi-logarithmischer Abtastrate gemessenen Daten. Dabei geht es allerdings nur noch um eine Reduktion von Datenpunkten, die ja bereits mehr oder weniger logarithmisch verteilt liegen. In beiden Fällen sorgt die Software für eine Zusammenfassung auf ca. 110 Mess-

4 Messmethoden und Auswertung

punkte auf der Zeitachse¹¹. Die somit erhaltene Matrix dient als Ausgangspunkt der weiteren Bearbeitung.

Ein wichtiges Werkzeug in der weitergehenden Analyse ist die *Singulärwertzerlegung* (SVD¹²). Mit deren Hilfe wird die Datenmatrix **A** (in den Spalten die Spektren, in den Zeilen die Zeitverläufe) in drei Matrizen folgendermaßen aufgespalten:

$$\mathbf{A} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{V}' \quad (4.2)$$

Dabei sind **U** und **V** orthogonale Matrizen, die ein System von Basisvektoren für den Spektrenraum (**U**) bzw. den Raum der Zeitverläufe (**V**) in ihren Spalten enthalten. Die Matrix **S** ist diagonal und enthält die sogenannten *Singulärwerte*. Deren Anordnung ist so gewählt, dass die Werte mit zunehmendem Index abfallen.

Da die Basisvektoren in **U** und **V** normiert sind, ihre „Länge“ in einem gemessenen Spektrum also durch den entsprechenden Singulärwert gegeben ist, ist der Singulärwert ein Maß dafür, wie stark die Basisvektoren zur Rekonstruktion der realen Spektren beitragen. Die wichtigsten sind folgerichtig diejenigen mit niedrigem Index.

Bei einer idealen Messung wäre die Anzahl der notwendigen Basisvektoren gegeben durch den Rang der Matrix; bei den vorliegenden realen Messungen verlieren sich die Basisvektoren mit hohen Indices in der Beschreibung des Rauschens. Für weitergehende Analysen ist es somit von Vorteil, die Anzahl an signifikanten Komponenten herauszufinden und mit diesen weiter zu arbeiten. Beispielsweise ist die Anpassung einer Summe von Exponentialfunktionen an die Zeitverläufe nach der Reduktion auf die Hauptkomponenten sehr viel einfacher (näheres dazu im Anhang A.3), ohne dass ein Informationsverlust eingetreten ist. Genauso ist die Rekonstruktion der Datenmatrix mit Hilfe nur der signifikanten Komponenten sinnvoll, um das Rauschen zu unterdrücken und z.B. Zeitverläufe genauer darstellen zu können.

Die Bestimmung der *Anzahl* der signifikanten Komponenten geschieht über einen Vergleich der Signale der Komponenten mit dem Rauschlevel sowohl auf spektraler als auch auf Transientenebene: Nicht signifikante Komponenten zeigen spektral ein Rauschen, dessen Höhe im wesentlichen durch den Verlauf des Einkanalpektrums gegeben ist. Im Bereich geringer Transmission — in unserem Aufbau also z.B. im Bereich der Absorption der Wasserbiegeschwingung um 1650 cm^{-1} — ist das Rauschen stark erhöht. Dementsprechend erhält man einen Zeitverlauf der Komponente, der leicht von einem Proteinsignal unterscheidbar ist: Diese müssen bei den betrachteten zyklischen Reaktionen wieder auf Null zurückgehen, wohingegen die Rauschsignale mit zunehmender Zeit und damit zunehmendem Abstand

¹¹ Auf der Wellenlängenskala dagegen ist eine Mittelung nicht sinnvoll: Ein Bereich, wo sich der Wert der Datenspur nur noch wenig mit dem Datenpunkt ändert, ist hier nicht zu finden. Im Gegenteil, eine höhere Auflösung als die standardmäßig benutzten 4.5 cm^{-1} wäre manchmal wünschenswert.

¹² *singular value decomposition*

4.1 Zeitauflösende FTIR-Spektroskopie

vom Referenzspektrum stärker werden. Zusätzlich erkennt man in vielen Fällen Schwingungen im späten Zeitbereich z.B. mit 50 Hz, die auf eingefangene Störsignale hindeuten.

In den meisten Fällen lässt sich mit Hilfe dieser Kriterien die Anzahl der signifikanten Komponenten hinreichend genau bestimmen, wobei im Zweifelsfall eher eine Komponente zu viel benutzt wird. Eine streng mathematische Behandlung der Signifikanz ist ebenfalls möglich, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht benutzt.

Die letzte Standardprozedur der Datenverarbeitung ist die Analyse der Kinetik. Geht man von Reaktionen erster Ordnung aus, die die Übergänge zwischen Intermediaten des Proteins beschreiben, so lässt sich bei beliebigen Hin-, Quer- und Rückreaktionen jeder Zeitverlauf durch eine Summe von Exponentialfunktionen anpassen. Ohne ein Modell des Zyklus vorauszusetzen, ermöglicht diese Anpassung den Vergleich unterschiedlicher Messungen und die Beurteilung des Einflusses äußerer Parameter. Im Wesentlichen ist die Beschreibung anhand von Zerfallskonstanten in dieser Arbeit also eher deskriptiv.

Zur rechnerischen Anpassung wird eine *Matlab-toolbox* namens *solvopt* [65] benutzt. Dem Programm wird eine zu minimierende Funktion sowie die Parameter und die Startwerte übergeben, wonach es eigenständig nach einer MARQUARD-ähnlichen Prozedur einen nichtlinearen Fit durchführt. In diesem Fall ist die zu minimierende Funktion die Summe aller quadratischen Abweichungen zwischen den übergebenen Zeitspuren (die im allgemeinen den signifikanten Komponenten aus der SVD-Analyse entsprechen) und den Zeitspuren, die sich aus der Summe der Exponentialfunktionen ergeben. Die Parameter, die *solvopt* variiert, sind die Zerfallskonstanten der e-Funktionen; die Ermittlung des „besten“ Amplitudensatzes für die jeweilige Zeitspur ist ein *lineares* Problem und lässt sich somit analytisch per Regression lösen. Näheres zur Fitprozedur findet sich in Anhang A.3.

Die Güte des Fits wird durch die entsprechenden Residuen und deren Verhältnis zum Rauschlevel beurteilt und unter Umständen durch die Hinzunahme weiterer Exponentialfunktionen verbessert.

AC-gekoppelte Messungen

Bei den nach der Prozedur in Abschnitt 4.1.5 durchgeführten AC-gekoppelten Messungen muss die Umrechnung der Interferogramme in Spektren mit Hilfe einer Phase aus der vorangegangenen Messung erfolgen. Da die *Bruker*-Software dazu nicht in der Lage ist, wurden zwei *Matlab*-Programme geschrieben, die die Umrechnungen analog zur *Opus*-Software vornehmen¹³, aber z.B. Flexibilität in der

¹³ Die erste Programmierung orientierte sich an einer Veröffentlichung zweier *Bruker*-Mitarbeiter [48]. Leider ergaben sich teils deutliche Abweichungen von den *Opus*-Ergebnissen. Eine Nachfrage ergab schließlich, dass *Bruker* die Routinen zur Interferogramm-Umrechnung geändert hatte.

4 Messmethoden und Auswertung

Phasenwahl zulassen.

Die beiden zusammengehörigen step-scan-Messungen (eine steady-state-Messung mit DC-Kopplung zur Bestimmung der Phase und des Einkanalspektrums des Grundzustandes, und die eigentliche AC-gekoppelte zeitaufgelöste Messung) werden auf den PC übertragen und die Messdaten extrahiert. Im ersten Durchlauf wird dann die DC-gekoppelte Messung analysiert:

- Da es sich um eine steady-state step-scan-Messung zur Bestimmung der Referenz handelt, werden alle Daten zu einem Interferogramm zusammengefasst.
- Dieses einseitige Interferogramm enthält einen kleinen doppelseitigen Teil, der zur Bestimmung der Phase benutzt wird¹⁴.
- Dieser doppelseitige Bereich wird apodisiert, zero-filled und für die numerische Durchführung der FFT so geschoben, dass der *centerburst* am linken Rand liegt. Die anschließende FFT liefert dann aus dem komplexen Spektrum die Phasenfunktion.
- Das einseitige Interferogramm wird analog dazu präpariert: Apodisation, zero-filling und centerburst-shift.
- Nach der anschließenden FFT wird die Phase nach derjenigen aus dem doppelseitigen Interferogramm korrigiert und man erhält einerseits ein Einkanalspektrum des Grundzustandes, andererseits die Phasenfunktion, die auch bei der zeitaufgelösten Messung benutzt werden kann.

Das zweite Programm benötigt als zusätzliche Eingabe die Phasenfunktion und das Einkanalspektrum des Grundzustandes:

- Da es sich diesmal um eine echte zeitaufgelöste Messung handelt, werden alle nachfolgenden Operationen auf jedes einzelne Interferogramm angewendet.
- Die einseitigen Interferogramme werden apodisiert, zero-filled und auf ihren *centerburst* geschiftet.
- Die FFT wird gefolgt von einer Korrektur mit der vorher bestimmten Phasenfunktion und man erhält AC-gekoppelte Differenzspektren.
- Aus diesen Spektren werden dann mit Hilfe des Einkanalspektrums des Grundzustandes „echte“ Differenzspektren berechnet. Die Information über die ursprüngliche Höhe einer Bande und ihrer dann relativen Änderung war vorher nicht vorhanden.

¹⁴ Die Phase sollte mit einer geringeren Auflösung bestimmt werden, da sie sich recht langsam mit der Spiegelstellung ändern sollte.

4.2 Resonanz-Raman-Spektroskopie

- Analog zur Vorgehensweise bei normalen step-scan-Messungen wird nun die Anzahl der Spektren verringert, indem eine Zusammenfassung auf einer logarithmischen Skala erfolgt.

Ebenfalls analog zur Standardauswertung kann die Auswertung nun mit SVD und Exponentialanpassung fortgesetzt werden.

4.2 Resonanz-Raman-Spektroskopie

4.2.1 Spektrometerausstattung

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Ramanspektren wurden mit einem *Lab-ram*-Spektrometer der Firma *Dilor* aufgenommen. Dieses auf *Notch*-Filtern basierende System erlaubt die Verwendung mehrerer Anregungslaser und -wellenlängen. Der prinzipielle Aufbau ist in Abb. 4.5 gezeigt.

Der Laserstrahl gelangt über eine Blende in das Gerät und wird über die Spiegel M_1 und M_2 , die im Wesentlichen der Strahljustage dienen, nacheinander auf ein Filterrad und eine Sammellinse geführt. Die per Software steuerbaren Filter erlauben die Abschwächung des Lasers, die Sammellinse fokussiert den mittlerweile recht breiten Strahl¹⁵ auf das erste konfokale Pinhole. Der von M_4 umgelenkte Strahl trifft dann auf das zentrale Element, den Notchfilter, der speziell auf die gerade verwendete Laserwellenlänge abgestimmt sein muss. In diesem Fall wird der Strahl reflektiert und in das Mikroskop der Fa. *Olympus* eingekoppelt. Der Spiegel M_4 und der Notchfilter sind auf einem gemeinsamen Schlitten so angebracht, dass der Einfallswinkel des Lasers auf den Filter variiert werden kann, ohne dass der nachfolgende Strahlengang beeinflusst wird. Eine Korrektur des Filterwinkels wird also durch eine Korrektur von M_4 ausgeglichen und ermöglicht so ein leichtes Schieben des Bandbereichs des Notchfilters auf der Wellenlängenachse.

Im Mikroskop nimmt der Laserstrahl den klassischen Strahlengang und wird auf die Probe, die sich auf einem *xy*-Tisch befindet, fokussiert. Dazu stehen Objektive mit 10-facher (Numerische Apertur $A = 0.25$), 50-facher ($A = 0.75$) und 100-facher ($A = 0.9$) Vergrößerung zur Verfügung; ein Immersionsobjektiv mit 90-facher Vergrößerung ($A = 1.2$) ergänzt das Sortiment und erlaubt die direkte Messung in einer wässrigen Lösung. Bei an- oder ausgeschaltetem Laserstrahl lässt sich der Probenbereich über eine Videokamera beobachten, die mit Hilfe eines Strahlteilers im Strahlengang belichtet wird¹⁶. Der so angefahrene, beleuchtete Bereich der Probe strahlt entsprechend Licht ab, das aus RAYLEIGH-Streulicht, Fluoreszenz und Ramangestreutem Licht besteht. Dieses rückgestreute Spektrum

¹⁵ Je nach verwendetem Laser beträgt der Abstand von der Ausgangsapertur desselben bis zur Eingangsblende des Spektrometers bis zu 2 m.

¹⁶ Für die Messung des Ramansignals wird dieser Strahlteiler per Hand herausgefahren, so dass das komplette Licht auf den Detektor fällt.

4 Messmethoden und Auswertung

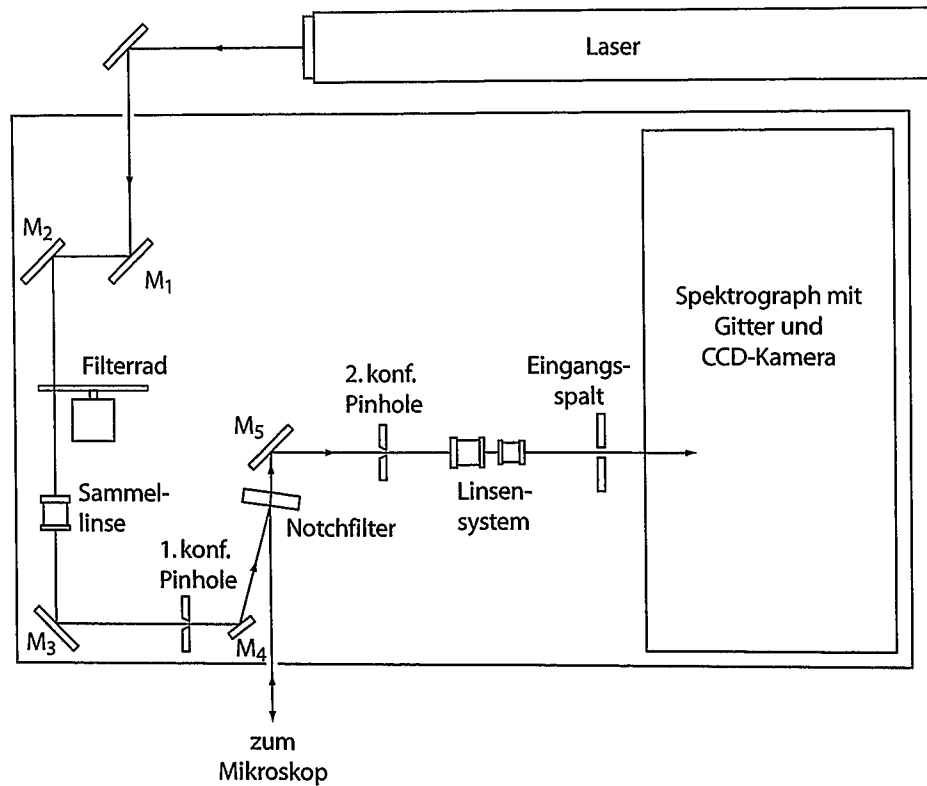


Abbildung 4.5 Der prinzipielle Aufbau des Raman-Spektrometers *Labram* von *Dilor*. Das Gerät basiert auf einem Notchfiltersystem, das es erlaubt, den gleichen Strahlengang durch das Mikroskop sowohl für die Anregung als auch für das Ramansignal zu nutzen (Rückstreuanordnung). Mit einer optischen Dichte von 6 macht er gleichzeitig die Verwendung von Doppel- oder sogar Tripelmonochromatoren überflüssig.

an Licht wird nun über den gleichen Strahlengang im Mikroskop gesammelt und trifft schließlich ebenfalls auf den Notchfilter. Die frequenzverschobenen Anteile des Spektrums werden nun — so sie denn weit genug von der Anregungswellenlänge entfernt liegen — vom Filter durchgelassen und treffen auf den Spiegel M_5 .

Um auch für den Sammelstrahlengang eine Konfokalität zu schaffen, folgt nach diesem Spiegel ein zweites konfokales Pinhole¹⁷, dessen Größe über die Software geregelt werden kann. Falls es also auf maximales Signal und nicht auf optimale Ortsinformation ankommt, kann dieses Pinhole geöffnet werden. Es folgt ein Linsensystem, das den Strahl erst parallelisiert und dann auf den Eingangsspalt

¹⁷ Die Optik des Mikroskops bildet das erste konfokale Pinhole auf die Probe ab, genauso, wie die Probe auf das zweite konfokale Pinhole abgebildet wird; die optischen Weglängen vom ersten Pinhole zur Probe und von der Probe zum zweiten Pinhole müssen also gleich sein.

4.2 Resonanz-Raman-Spektroskopie

des Spektrographen abbildet. Zwischen den beiden Linsen ist somit eine optimale Stelle zur zusätzlichen Einführung von Filtern.

Der Spektrograph enthält ein Gitter mit 1800 Strichen/mm (bei 300 nm geblazed¹⁸) oder 600 Strichen/mm (im roten Wellenlängenbereich geblazed), die je nach Signalhöhe, gewünschtem Wellenlängenbereich oder gewünschter Auflösung benutzt werden können. Das gewählte Gitter fächert den Strahl in Abhängigkeit der Wellenlänge auf und sein Kippwinkel, der über die Software eingestellt werden kann, bestimmt den gemessenen Wellenlängenbereich. Je nach Winkel trifft nämlich anschließend nur ein bestimmter Bereich auf den Detektor, der aus einem Peltiergeköhlten CCD-Chip besteht. Die Optik ist so angelegt, dass mehrere Zeilen dieses Chips beleuchtet werden, die zur Mittelung des Signals dann zusammengezogen werden und eine Intensität in Abhängigkeit der Pixellage ausgeben. Zusammen mit einer Kalibrierung, z.B. mit Hilfe einer Neon-Lampe, lassen sich daraus Spektren berechnen.

4.2.2 Anregungslaser

Zur Ramananregung der Probe kommen zwei verschiedene Laser zur Anwendung: Ein luftgekühlter Argonionenlaser (*Melles & Griot Omnichrome*), der bei einer Wellenlänge von 457 nm für das Ramanspektrometer genutzt werden kann¹⁹, sowie ein wassergekühlter Kryptonionenlaser von *Coherent* (Modell *Innova 90C*). Von dessen Laserwellenlängen, die sich nahezu über den gesamten sichtbaren Bereich erstrecken, können mit der vorliegenden Apparatur 413 nm, 568 nm und 752 nm genutzt werden. Die Laser liegen hinter dem Spektrometer übereinander angeordnet und strahlen auf einen Strahlaufzug, der einerseits die Auswahl des Lasers vornimmt und andererseits den entsprechenden Strahl in die Eingangsblende des Spektrometers einkoppelt.

Zum Wechsel der Anregungswellenlänge ist somit im optimalen Fall nur ein Spiegel umzulegen (wenn der andere Laser zum Einsatz kommt), bzw. die Wellenlänge des Kr^+ -Lasers zu ändern, und der entsprechende Notchfilter einzusetzen. In der Praxis ist aber in beiden Fällen eine leichte Nachjustage des Strahlengangs notwendig. Allein der Wechsel des Filters sorgt für genügend große Änderungen im

¹⁸ Die einzelnen Gitterelemente werden so angeschrägt, dass die Richtung des Beugungsmaximums erster Ordnung, die von der Lage des Gesamtgitters abhängt, mit der Richtung der Reflexion an einem einzelnen Element übereinstimmt. Damit geht ein Großteil der eingestrahnten Intensität in diese Richtung statt in die Richtung des nicht nutzbaren Maximums nullter Ordnung. Da die Stellung des Gitters zum einfallenden Strahl von der Anregungswellenlänge abhängt, lässt sich diese Optimierung allerdings nur für eine Wellenlänge durchführen (z.B. [66]).

¹⁹ Wie bereits oben angesprochen ist bei einem Ramanspektrometer, das auf Notchfiltern basiert, die Menge der nutzbaren Laserwellenlängen dadurch beschränkt, dass für jede einzelne ein eigener Notchfilter zur Verfügung stehen muss. Der Vorteil eines Aufbaus mit Hilfe dieser recht teuren Komponenten liegt aber in der verlustarmen und einfachen Strahlführung.

4 Messmethoden und Auswertung

Strahlengang, dass Korrekturen unumgänglich sind. Auch ein Wechsel der Wellenlänge des Kryptonlasers hat einen veränderten Strahlverlauf durch den Resonator zur Folge und resultiert somit in einem Strahlversatz. Als Justagehilfe dient eine Diode, die vom Spektrographen aus in umgekehrter Strahlrichtung durch das zweite konfokale Pinhole, durch den Notchfilter in das Mikroskop eingekoppelt wird. Eine optimale Justage ist genau dann erreicht, wenn Anregungsbereich des Lasers und Sammelbereich, der durch die Diode dargestellt wird, übereinander liegen.

Trotz der Nachjustage erlaubt der Aufbau die Variation von vier verschiedenen Anregungswellenlängen in relativ kurzer Zeit und deckt damit den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich ab.

4.2.3 Statische Messungen

Da es sich bei HR und BR um lichtgetriebene Proteine handelt, die ein entsprechendes Chromophor besitzen müssen, ist die Gefahr einer Schädigung der Probe durch zu starkes Messlicht immer gegeben. Insbesondere im Fall der Ramanspektroskopie über einen Mikroskopaufbau, bei dem die eingesetzte Laserstrahlung sehr stark fokussiert wird, erreicht man extrem hohe Lichtintensitäten. Bei allen durchgeführten statischen Messungen wurde deshalb die Degradation der Probe untersucht und gegebenenfalls die eingestrahlte Intensität verringert. Allgemein wurden drei Präparationen verwandt:

- Das Protein befindet sich in Lösung und wird entweder in einer Glaskapillare, oder in einer Küvette für die sichtbare Spektroskopie gemessen. Dabei kommt unter Umständen, um die Lichtintensität noch weiter zu verringern, statt eines normalen Mikroskopobjektivs eine Umlenklupe zum Einsatz. Mit einer Brennweite von 4 cm und einem recht großen Fokusvolumen wird die Probe deutlich weniger strapaziert. Im Vergleich dazu kommt die Kapillarmethode mit deutlich weniger Protein aus, macht aber die Verwendung eines Objektivs mit entsprechender Vergrößerung notwendig, um störende Ramanbanden des Glases auszuschließen.
- Das Protein wird unter Stickstoffstrom auf einem Glasträger eingetrocknet und bildet einen Film, der analog zu den ATR-Präparationen rehydratisiert werden kann. Mit Hilfe des Immersionsobjektivs läßt sich der Film anschließend „unter Wasser“ messen. Der Vorteil hierbei ist — ebenfalls analog zur ATR-Technik — die Anreicherung von Protein in einem bestimmten Bereich, so dass stärkere Signale erreicht werden können.
- Es werden Proteinkristalle vermessen: Bei dieser Methode erhält man die weitaus stärksten Ramansignale, da die Konzentration des Proteins im Kristallverband maximal ist. Die typische Größe der Kristalle im Bereich von

4.2 Resonanz-Raman-Spektroskopie

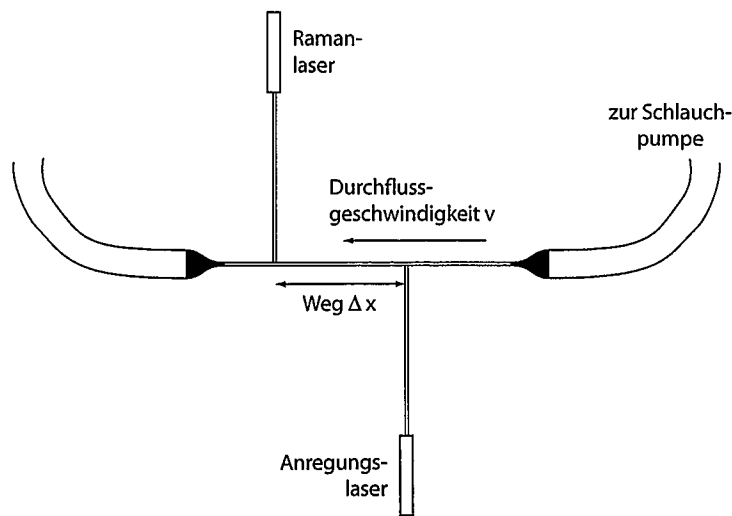


Abbildung 4.6 Schematischer Aufbau der Durchflussszelle, wie sie für die Ramanmessungen benutzt wurde. Mit Hilfe einer Schlauchpumpe wird die Proteinlösung umgepumpt und durch eine Kapillare geführt, die zusätzlich noch leicht ausgezogen wurde. Der Aufbau erlaubt einerseits die Messung von Proteinen ohne große Gefahr durch Lichtschädigung, andererseits bei Verwendung eines zweiten Anregungslasers die zeitaufgelöste Messung des Proteins.

einigen 10 Mikrometern ist bei Verwendung eines entsprechenden Objektivs völlig ausreichend.

Wenn man lichtabsorbierende Proteine messen will, wird — der hohen Proteindichte entsprechend — leider auch extrem viel Energie im Kristall deponiert. Insofern ist das Problem der Photoschädigung im Fall von Kristallmessungen noch verschärft, zumal eine Verwendung von niedriger auflösenden Objektiven nicht in Frage kommt.

4.2.4 Durchflussszelle

Um die Problematik der Photobleichung und -schädigung weiter zu verringern, ist die Verwendung einer Durchflussszelle sinnvoll. Je nach gewählter Durchflussgeschwindigkeit ist die Verweildauer der Probe im Fokus des Lasers zu gering, um Schädigungen zu verursachen. Für solche Messungen wurde deshalb eine Zelle gebaut, die mit möglichst wenig Probenlösung einen hohen Durchfluss erreicht.

Der schematische Aufbau der Zelle ist in Abb. 4.6 gezeigt. Die ca. 800 μl Proteinlösung werden mit Hilfe einer Schlauchpumpe umgepumpt und durch eine 20 μl -Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 700 μm und einer Wandstärke von 250 μm geführt. Um die Flussgeschwindigkeit weiter zu erhöhen, wurde eine kleiner Bereich unter einer Flamme ausgezogen und ein Durchmesser im Inneren von

4 Messmethoden und Auswertung

ca. 325 μm und einer Wandstärke von 100 μm erreicht. Bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit der Schlauchpumpe wird auf diesem Wege ein Fluss von 5 ml/min erreicht, was einer ungefähren Geschwindigkeit in der Kapillare von 1 m/s entspricht.

Dieser dünnste Bereich der Kapillare wird dann unter dem Mikroskop fixiert und mit einem 50-er Objektiv angefahren. Dessen Arbeitsabstand ist groß genug, um den Fokus des Lasers komplett in das Innere der Kapillare fahren zu können. Mit Hilfe des Ramansignals der Glaswand kann das Durchfahren der Wandung direkt beobachtet werden.

Wie in Abb. 4.6 ebenfalls gezeigt, kann dieser Aufbau auch für zeitauflösende Messungen an lichtgetriebenen Proteinen genutzt werden: Ein zweiter Laser (*pump*-Laser) regt die Proteine an, wonach in einem Abstand Δx , der bei laminarem Fluss einer bestimmten Zeit Δt nach der Anregung entspricht, das Ramansignal abgefragt wird. Durch Variation des Abstands lässt sich prinzipiell der gesamte Photozyklus messen. Die Zeitauflösung wird in diesem Fall gegeben durch

- die Verwirbelungen in der Strömung der Proteinlösung, die Geschwindigkeitsunterschiede hervorrufen,
- das Verhältnis von Fokusgröße der Laser und deren Abstand,
- und Proteinanregungen durch Streulicht.

Um Fehler durch diese Störquellen auszuschließen, wurde bei zeitaufgelösten Messungen mit Hilfe von bekannten Intermediatspektren, z.B. von BR, der korrekte Aufbau überprüft.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

Die Benutzung von *polarisiertem* infraroten Licht in Messungen an Proteinen fügt einen Parameter hinzu, der Informationen über die dreidimensionale Lage einer Schwingung im Raum liefern kann. Voraussetzung dafür ist allerdings die Orientierung der Probe auf dem ATR-Kristall¹. Wie bereits erwähnt besitzt ein eingetrockneter BR-Film diese Eigenschaft mit einer bevorzugten Orientierung der Membranfragmente parallel zur Oberfläche. Im Folgenden wird versucht, die zusätzlichen Informationen über die Lage von Übergangsdipolmomenten einerseits zur Bestimmung von Winkeln gegenüber der Normalen zu nutzen, andererseits diesen Parameter bei zeitaufgelösten Messungen zu einer besseren Auftrennung und Charakterisierung von Intermediatspektren zu nutzen.

5.1.1 Probenpräparation und stationäre Messungen

Der Vorgang der Probenpräparation ist in den Abbildungen 5.1 und 5.2 dargestellt. In 5.1 sieht man im oberen Teil Absorptionsspektren eines eingetrockneten BR-Films, die jeweils mit *p*- bzw. *s*-polarisiertem Licht aufgenommen wurden. Der untere Bereich stellt das daraus berechnete lineare dichroitische Verhältnis dar. Auffällig sind die charakteristischen Proteinbanden Amid I und Amid II um 1650 cm^{-1} bzw. 1550 cm^{-1} , deren relative Verhältnisse in den beiden Spektren stark variieren: Im *p*-polarisierten Spektrum ist die Amid I Bande größer als die Amid II, im *s*-polarisierten Verlauf umgekehrt. Analog spiegelt sich dies im dichroitischen Verhältnis wider: Über einen großen Bereich des Spektrums sind die Variationen recht gering und bewegen sich um ein Verhältnis von ca. 1.5; im Bereich der Amidbanden dagegen erkennt man einen starken Lineardichroismus.

Analog zu dieser Darstellung zeigt Abb. 5.2 dieselbe Probe, nachdem mit einer Pufferlösung (1 M KCl; 10 mM PO_4 , pH 7.2) rehydratisiert wurde. Dabei dringt Wasser zwischen die Filmschichten ein und sorgt für ein Anschwellen derselben. Dementsprechend geht die Amid II Absorption zurück. Dies lässt sich im Amid I

¹ Verhält sich die Probe isotrop, wie es im Allgemeinen z.B. bei Flüssigkeiten der Fall ist, so sollten sich die Spektren der verschiedenen Polarisationsrichtungen nur durch einen Faktor unterscheiden. Dieser spiegelt die unterschiedliche Eindringtiefe wider.

5 Ergebnisse und Diskussion

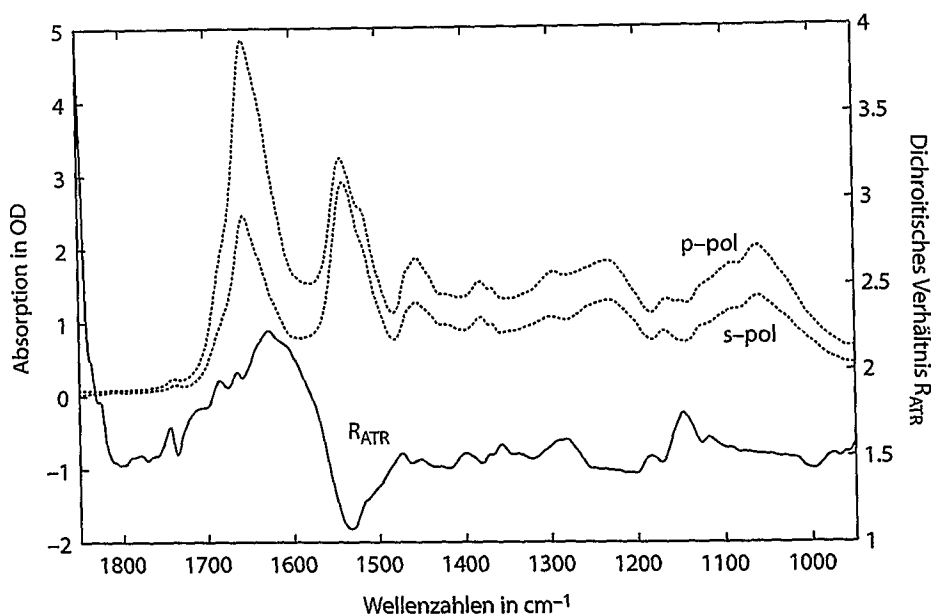


Abbildung 5.1 Infrarotabsorptionsspektrum eines *eingetrockneten* BR-Films gemessen mit *p*-polarisiertem und *s*-polarisiertem Licht. Die untere Kurve zeigt das aus diesen Messungen berechnete dichroitische Verhältnis $R_{ATR} = A_{p-pol}/A_{s-pol}$. Man erkennt den starken Dichroismus der beiden Amidbanden.

Bereich nicht beobachten, da hier die Proteinschwingung von der starken Wasserbiegeschwingung überlagert und der Absorptionsverlust kompensiert wird. Erst im Verlauf des dichroitischen Verhältnisses lassen sich Amid I Bande und Wasserbande trennen: Das Dipolmoment der Wasserbiegeschwingung verhält sich isotrop und liefert somit keine Bande im Dichroismusspektrum; dagegen liegen die α -Helices bevorzugt senkrecht zur Oberfläche, was in einer relativ stärkeren Absorption bei *p*-polarisiertem Licht resultiert. Dementsprechend findet sich eine im Vergleich zum Absorptionsspektrum deutlich schmalere Bande im Dichroismusspektrum mit einem Maximum bei 1666 cm^{-1} . Im Vergleich mit Literaturangaben (z.B. [67, 68, 69]), die die Lage von α -Helix-Banden knapp unterhalb von 1660 cm^{-1} beschreiben, erscheint dies etwas zu hoch. Allerdings wird die Lage durch die starke Wasserabsorption, die zusätzlich noch in den nichtlinearen Bereich des Detektors ragt, verfälscht.

Wie bereits erwähnt sind die Variationen des dichroitischen Verhältnisses im größten Teil der Spektren gering; man findet im trockenen Film ein mittleres Verhältnis von ca. 1.5, im rehydratisierten Spektrum einen Wert um 1.7. Geht man davon aus, dass in diesen Bereichen des Spektrums so viele unterschiedliche Banden absorbieren, dass die entsprechenden gemittelten Orientierungen mehr oder weniger isotrop sind, so ist diese Basislinie im Dichroismusspektrum ein Maß für den

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

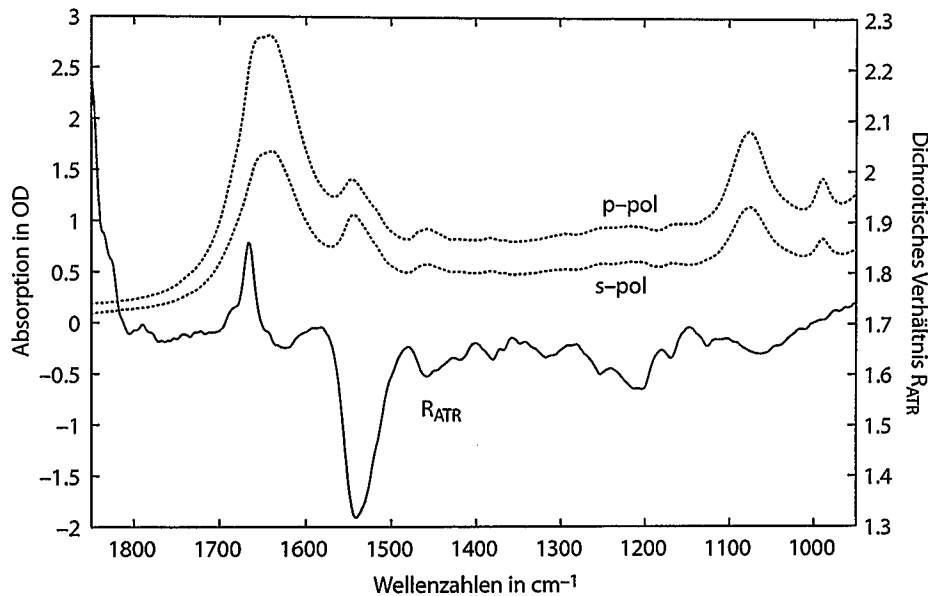


Abbildung 5.2 Spektren des *rehydratisierten* BR-Films aus Abb. 5.1. Durch Überschichten mit Pufferlösung dringt Wasser in den Film ein und bringt diesen zum Anschwellen. Damit wandert Protein aus der evaneszierenden Welle heraus, die Intensität der Amid II Bande nimmt ab. Diese Abnahme kann man an der Amid I Bande nicht erkennen, da sie überlagert wird von der zunehmenden Wasserabsorption. Erst im dichroitischen Verhältnis R_{ATR} erkennt man die Lage der Amid I Bande, die im linken Bereich der breiten Absorption um 1650 cm^{-1} liegt, während sich die H_2O -Biegeschwingung im rechten Bereich isotrop verhält.

Dichroismus einer *isotropen* Probe. Die unterschiedlichen Werte je nach Wassergehalt lassen den Rückschluss auf einige Versuchsparameter zu: Unter der Voraussetzung, dass die *thick-film*-Näherung nach HARRICK in diesem Fall anwendbar ist² und der Einfallswinkel des IR-Strahls nach den Angaben des Herstellers ca. 45° beträgt, sollte das dichroitische Verhältnis einer *isotropen* Probe unabhängig vom Verhältnis der Brechungsindizes gleich 2 sein. Dies ist für das vorliegende Setup offensichtlich nicht der Fall. Da der Proteinfilm mit großer Sicherheit eine ausreichende Schichtdicke erreicht (wenigstens nach dem Anschwellen bei Rehydratisierung), ist davon auszugehen, dass der Einfallswinkel nicht mit 45° angenommen werden kann. In diesem Fall ist das resultierende, dichroitische Verhältnis R_{ATR}^{iso} einer isotropen Probe abhängig von n_{21} , dem Verhältnis der Brechungsindizes n_2 (Probe) und n_1 (Diamant) und kann somit die zwei unterschiedlichen gemessenen

² Dies ist nach Abschnitt 3.2.4 genau dann erfüllt, wenn die Filmdicke deutlich größer als die Eindringtiefe der evaneszierenden Welle ist. Bei den in diesen Versuchen benutzten Proteinmengen ist diese Bedingung allein schon deshalb erfüllt, um ein optimales Proteinsignal zu erhalten, die effektive Proteinmenge im Strahl also auf jeden Fall maximal ist.

5 Ergebnisse und Diskussion

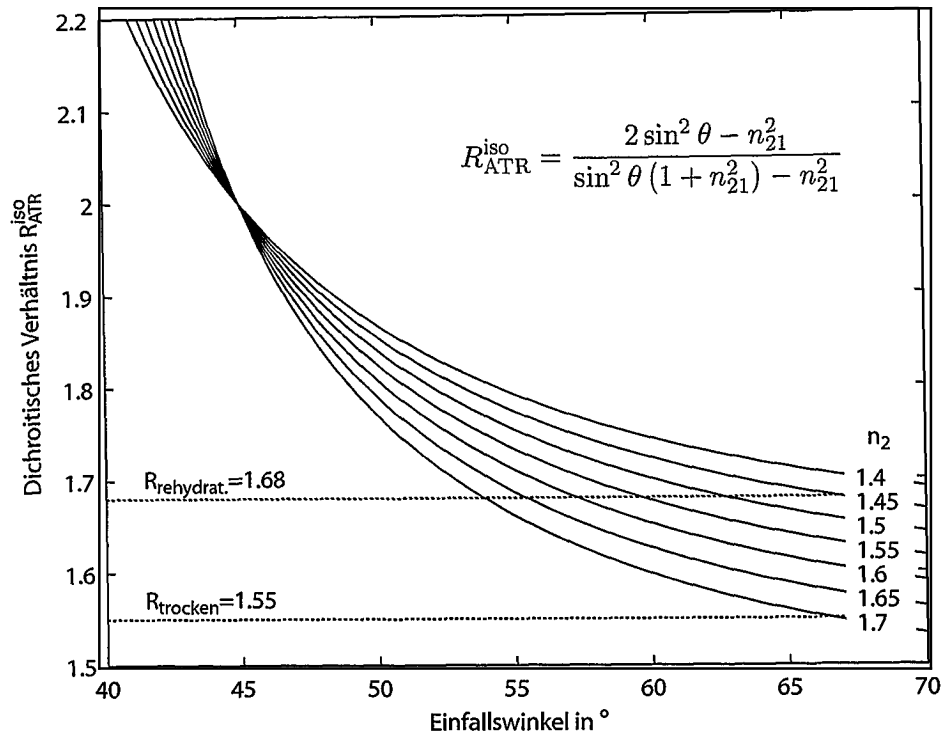


Abbildung 5.3 Theoretischer Verlauf des dichroitischen Verhältnisses einer *isotropen* Probe in Abhängigkeit des Einfallswinkels. Je nach benutztem Brechungsindex n_2 für die Probenschicht (für Diamant wird $n_1 = 2.4$ benutzt) ergibt sich ein anderer Verlauf. Allerdings erhält man für einen Einfallswinkel von 45° ein dichroitisches Verhältnis von 2 unabhängig vom Brechungsindex.

Werte erklären.

Grundlegende Ursache wäre die Änderung des Brechungsindex der Probe bei Rehydratisierung. Abb. 5.3 zeigt den theoretischen Verlauf des dichroitischen Verhältnisses mit dem Einfallswinkel bei verschiedenen angenommenen Brechungsindizes n_2 der Probe und festem Brechungsindex des Diamanten von $n_1 = 2.4$. Erstere werden zwischen 1.4 und 1.7 variiert und decken somit den Bereich ab, den man in der Literatur für Lipide (1.4) und Proteine (1.7) findet (Übersicht z.B. in [70]). Das zusätzlich in die Schicht eindringende Wasser mit einem Brechungsindex im Infraroten zwischen 1.2 und 1.4 [71] wird z.B. nach der Effektiv-Medium-Theorie für einen tatsächlichen Brechungsindex *zwischen* dem der trockenen Schicht und dem von Wasser sorgen.

Der Vergleich der theoretischen Kurven mit den gemessenen Werten zeigt, dass eine Übereinstimmung erst bei hohen Einfallswinkeln erreicht wird. Sollte der angenommene Bereich der Brechungsindizes stimmen und das Ablesen von $R_{\text{ATR}}^{\text{iso}}$ aus den Abbildungen 5.1 und 5.2 erlaubt sein, so scheint der wirkliche Einfallswinkel

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

winkel deutlich höher zu liegen als angegeben. Tatsächlich ist dies aufgrund der individuellen Justage nicht auszuschließen und wird durch unabhängige Messungen an Flüssigkeiten, die sich *a priori* isotrop verhalten, bestätigt (nicht gezeigt). Die mögliche Fehlerquelle eines nicht festen Einfallswinkels sondern einer Verteilung um einen mittleren Winkel hat dagegen einen eher geringen Einfluss auf das resultierende dichroitische Verhältnis: Geht man von einer symmetrischen Verteilung um den mittleren Winkel aus, so ergibt sich bei 45° gar kein, und bei einem größeren Winkel ein Effekt in die „falsche“ Richtung: Das gemessene dichroitische Verhältnis wäre größer als bei einer scharfen Verteilung³.

Am gemessenen Anstieg des dichroitischen Verhältnisses bei Rehydratisierung und den theoretischen Verläufen in Abb. 5.3 erkennt man allerdings, dass — bei einem nicht geänderten Einfallswinkel — der Brechungsindex der Schicht offenbar kleiner geworden ist. Mit den oben erwähnten Literaturwerten von 1.4 für Lipide, ca. 1.3 für Wasser und 1.7 für Protein spricht dies für einen hohen Anfangswert, der eher im Bereich von 1.7 liegt und bei Hydratisierung in Richtung des Brechungsindex von Wasser zurückgeht. Dies stimmt damit überein, dass der Volumenanteil von BR an der Purpurmembran deutlich größer ist als der Anteil von Lipiden [72], und damit der Brechungsindex im trockenen Zustand im Bereich um 1.7 liegt.

Um einen nach Abb. 5.3 nicht unwahrscheinlich hohen Einfallswinkel annehmen zu müssen, wird bei allen folgenden Berechnungen in Abschnitt 5.1.3 von einem Winkel von 55° und einem Brechungsindex der Probe von 1.6 ausgegangen. Diese Werte sind konform mit dem gemessenen dichroitischen Verhältnis bei rehydratisierter Probe, wo die Gültigkeit der *thick-film*-Theorie gegeben sein sollte. Eine dementsprechend zu geringe Schichtdicke im Fall der trockenen Probe würde ein deutlich geringeres dichroitisches Verhältnis erklären [70]. Desweiteren erscheint ein aufgrund der Justage um 10° gegenüber dem theoretischen Strahlengang verkippter ATR-Aufbau als nicht unwahrscheinlich. Trotzdem muss bei allen Werten, die auf diesen Angaben fußen, die Unsicherheit in der Parameterwahl beachtet werden.

5.1.2 SVD-Analyse der zeitaufgelösten Messungen

Für die zeitaufgelösten Messungen mit jeweils *p*- und *s*-polarisiertem Licht wurden insgesamt 62 step-scan-Messungen verwandt, davon 18 mit *p*-polarisiertem Licht und 44 mit *s*-polarisiertem Licht. Pro Messung werden 844 Interferometerpunkte angefahren, in jeder Position 10 Photozyklen gemittelt und Zeitspuren mit 942 Zeiten auf einer quasilogarithmischen Achse aufgenommen, so dass 160 ms des Photozyklus überstrichen werden. Die Zeitdauer für eine Messung beträgt ca. 50 min.

³ Eine Verteilung im Einfallswinkel θ hat eine Verteilung in $\sin^2 \theta$ in der Formel von Abb. 5.3 zur Folge. Allerdings gilt bei symmetrischen Verteilungen um $\theta = 45^\circ$: $\sin^2 \langle \theta \rangle = \langle \sin^2 \theta \rangle$ und man erhält somit ein $\langle R_{\text{ATR}}^{\text{iso}} \rangle$, der dem einer scharfen Verteilung entspricht. Bei einem mittleren Winkel, der größer als 45° ist, gilt: $\sin^2 \langle \theta \rangle > \langle \sin^2 \theta \rangle$ und man erhält ein größeres $\langle R_{\text{ATR}}^{\text{iso}} \rangle$.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die unterschiedliche Anzahl an p - und s -polarisierten Messungen erklärt sich aus dem stark unterschiedlichen Signal/Rausch-Verhältnis: Wie die Absorptionsspektren in den Abbildungen 5.1 und 5.2 bereits gezeigt haben, ist die effektive Eindringtiefe von s -polarisiertem Licht unter den hier gewählten Bedingungen deutlich geringer als bei p -polarisiertem Licht, so dass entsprechend länger gemittelt werden muss. Im Vergleich zu nicht polarisierten Messungen kommt hinzu, dass die Intensität des Messlichts durch den Einfluss des Polarisators weniger als 50 % beträgt und damit das Signal/Rausch-Verhältnis zusätzlich verkleinert wird. Mit dem vorliegenden Aufbau lassen sich *unpolarisierte* zeitaufgelöste Spektren mit vergleichbarem Rauschen in ca. zwei Einzelmessungen erreichen.

Zur ersten Beurteilung der Messergebnisse zeigt die Abb. 5.4 die Komponenten einer *gemeinsamen* SVD-Analyse: Dabei wurden die beiden Datenmatrizen⁴ untereinandergehängt und eine SVD-Analyse der resultierenden Matrix durchgeführt. Anschließend werden die spektralen Verläufe wieder getrennt, so dass zu jeder Komponente in der Zeit *zwei* spektrale Komponenten gehören. Der Vorteil dieser Art der SVD-Zerlegung liegt darin, dass die beiden Spektren jeder Zeitkomponente direkt verglichen werden können: Beide Spektren zeigen exakt die gleiche zeitliche Entwicklung. Bei einer Einzelanalyse wäre dies nicht unbedingt zu erwarten: Im Allgemeinen erhält man zumindest leicht unterschiedliche Zeitverläufe, so dass die entsprechenden Spektren nicht kompatibel sind. Natürlich muss bei solch einer Analyse darauf geachtet werden, dass das Rauschen in beiden Messungen in einer ähnlichen Größe vorkommt, so dass eine spektrale Komponente in der einen Messung nicht mit Rauschen in der anderen verglichen wird.

Diese Art der Darstellung der zeitaufgelösten Daten bringt mit Hilfe relativ weniger Einzelspektren und Zeitverläufen die große Menge an Daten in eine übersichtliche Form: Die erste Komponente der SVD-Zerlegung gibt die größten Änderungen im Photozyklus wieder und zeigt dementsprechend die starken Änderungen der Retinalbanden: Die C=C-Doppelbindung des Grundzustandes (negativ) bei 1525 cm^{-1} ; die entsprechende, verschobene Bande während des Photozyklus (positiv) im Bereich um 1554 cm^{-1} , die von Änderungen in der Amid II Bande überlagert wird; sowie die C-C-Einfachbindungen des Grundzustandes bei 1253 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} und 1166 cm^{-1} . Die Unterschiede dieser Banden in der Absorption bei den verschiedenen Polarisationsrichtungen sind gering und zeigen bei allen negativen Banden des Grundzustandes ein ähnliches Verhältnis; das Übergangsdipolmoment sollte bei allen ungefähr gleich orientiert sein.

Die größten Unterschiede in dieser ersten Komponente finden sich im Bereich der Amid I Bande um 1650 cm^{-1} . Offensichtlich handelt es sich um Veränderungen, die mit p -polarisiertem Licht deutlich besser detektiert werden können als mit senkrechter Polarisation. Ähnlich verhält es sich mit der Bande um 1760 cm^{-1} , die

⁴ Diese enthalten die Absorptionsintensitäten in Abhängigkeit der Zeit (Zeilen) bzw. in Abhängigkeit der Wellenzahl (Spalten).

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

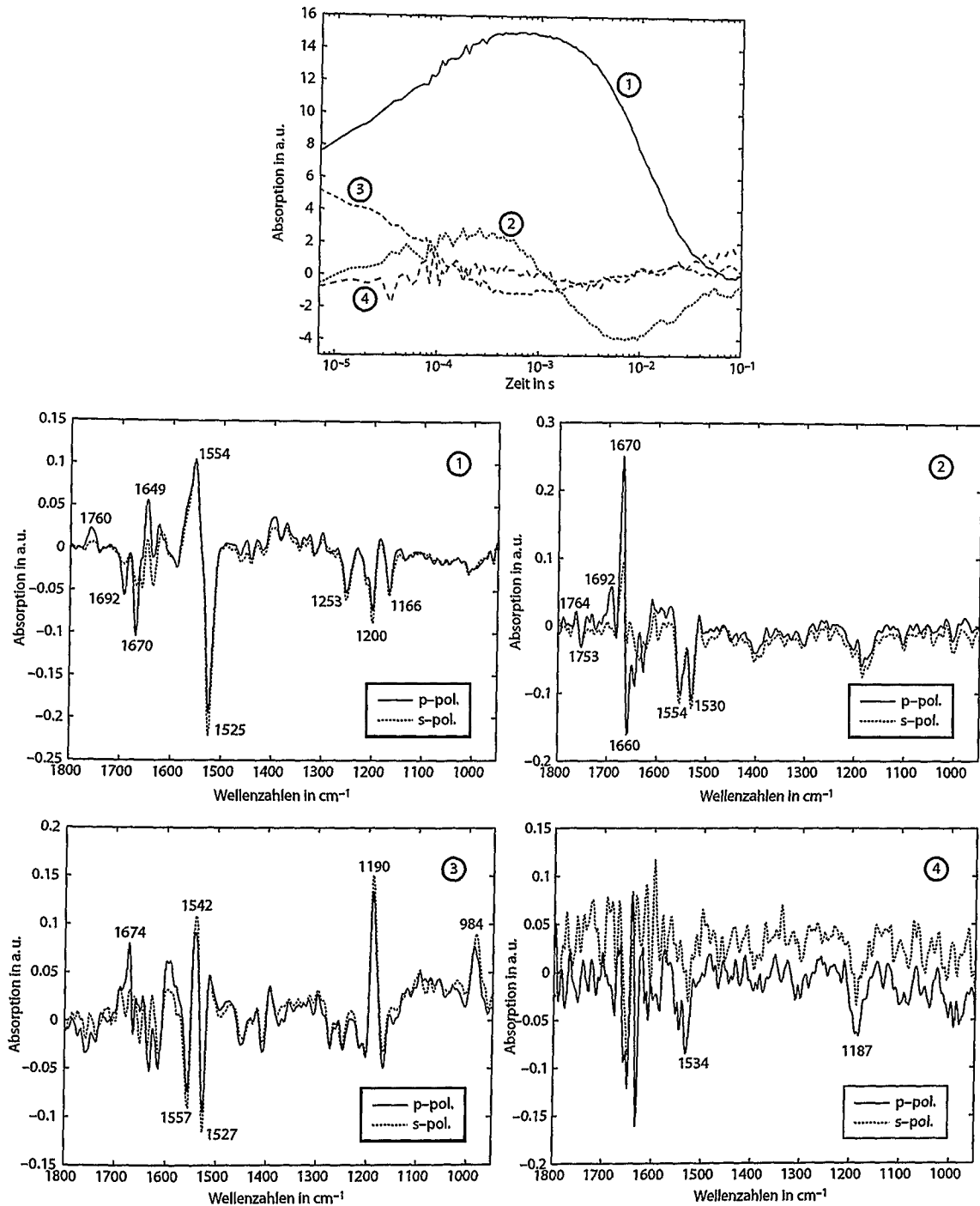


Abbildung 5.4 Gemeinsame SVD-Analyse der beiden Polarisationsmessungen bei pH 7.2, 10 mM PO_4 , 1 M KCl und 20°C : Die Matrizen der *p*- bzw. *s*-polarisierten Messung werden aneinandergehängt und eine SVD-Analyse der zusammengesetzten Matrix durchgeführt. Somit ist sichergestellt, dass die Zuordnung der Zeitverläufe übereinstimmt und somit die signifikanten Spektren untereinander verglichen werden können.

5 Ergebnisse und Diskussion

der bei Protonierung von Asp 85 entstehenden C=O-Bindung zuzuordnen ist [19].

Die zweiten Komponenten spielen nach dem entsprechenden Zeitverlauf vor allem zu späten Zeitpunkten eine Rolle: Das Minimum im Bereich von 10 ms fällt stärker ins Gewicht als das Maximum bei ca. 200 μ s, das aber von einer sehr starken ersten SVD-Komponente überlagert wird. Auffällig sind die prominenten Änderungen im Bereich der Amid I Bande: Die negative Absorptionsänderung bei 1670 cm^{-1} , wie sie bereits in der ersten Komponente zu finden ist, wird verstärkt⁵; zusätzlich taucht eine positive Bande bei 1660 cm^{-1} auf, die vorher nicht vorhanden war. Im Vergleich der Polarisationsrichtungen zeigen sich wiederum deutliche Unterschiede in diesem Frequenzbereich. Dagegen sind die leichten Änderungen im Bereich der Amid II bzw. Retinalbanden fast gleich groß und zeigen somit ähnliche Verhältnisse wie in der ersten Komponente. Nur knapp oberhalb des Rauschens erkennt man im Bereich jenseits von 1700 cm^{-1} , dass diese Komponente die Verschiebung der Asp 85 Absorption hin zu kleineren Wellenzahlen enthält.

Am Zeitverlauf der dritten Komponente liest man ab, dass diese vor allem im frühen Bereich der Messung stark zu den Spektren des Photozyklus beiträgt. Dies wird durch die typische positive Retinalbande bei 1190 cm^{-1} und die Banden der HOOP-Schwingungen⁶ des Retinals um 985 cm^{-1} bestätigt [73]. Beide Absorptionen sind charakteristisch für frühe Intermediate des Photozyklus. Die Unterschiede in der Polarisation sind wiederum typisch für Retinalbanden und werden durch leichte Änderungen im Bereich der Amid I Bande übertroffen, die aber schon deutliches Rauschen zeigen.

Die vierte Komponente zeigt — wie schon in Abschnitt 4.1.7 bei der Bestimmung der signifikanten Komponenten einer SVD-Analyse dargelegt — zwei Rauschspektren, deren Amplituden durch die Intensitätsverläufe des Einkanalspektrums gegeben ist: Das Rauschen im Amidbereich ist deutlich erhöht. Zusätzlich nimmt diese Komponente offensichtlich einen Offset auf und zeigt auch noch leichte Änderungen im Bereich der Retinaleinfachbindung. Dennoch ist, vor allem auch im Hinblick auf die Amplitudenhöhe im Zeitverlauf der Komponente, klar, dass es sich hierbei um eine nichtsignifikante Komponente handelt.

5.1.3 Lineardichroismus und Winkelberechnungen

Bei einer orientierten Probe auf dem ATR-Kristall ist die Berechnung des Winkels des Übergangsdipolmoments bei Verwendung von polarisiertem Messlicht prinzipiell möglich (vgl. Abschnitt 3.2.4). Allerdings hat schon der Abschnitt 5.1.1 gezeigt,

⁵In der SVD-Komponente ist diese Bande positiv. Da der entsprechende Zeitverlauf aber im hinteren Bereich *negativ* ist, setzt sich das gemessene Spektrum im Wesentlichen aus einer Linearkombination mit *positiver* Amplitude der ersten und *negativer* Amplitude der zweiten Komponente zusammen.

⁶Hydrogen-out-of-plane-Schwingung: Biegeschwingungen der Retinalwasserstoffe aus der durch das Retinal gebildeten Ebene heraus

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

dass in die Berechnungen eine Reihe von Parametern eingeht, deren Werte nicht bekannt sind, in einer unbestimmten Verteilung streuen oder auf Literaturangaben fußen, deren Übertragbarkeit auf das vorliegende Experiment mindestens zweifelhaft ist. Nichtsdestotrotz wird im folgenden versucht, Anhaltspunkte für Winkelberechnungen zu geben, um die vorliegenden Daten mit der Literatur zu vergleichen bzw. Tendenzen aus dem zeitlichen Verlauf der Orientierungen schließen zu können. Eine zusätzliche Fehlerquelle gerade bei Messungen im infraroten Spektralbereich mit den vielen Absorptionsbanden der Proteine ist die Überlappung von Absorptionen, die eine exakte Winkelberechnung in vielen Fällen unmöglich macht.

Für die Berechnungen wurden folgende Parameter benutzt, die entweder aus den Herstellerangaben und den Messungen aus Abschnitt 5.1.1 zusammengesetzt oder der Literatur entnommen wurden. Die Berechnung geht von der Anwendbarkeit der *thick film* Theorie nach HARRICK [53] aus.

Brechungsindices $n_{21} = \frac{n_2}{n_1}$	0.67	$n_1 = 2.4$ (Diamant); $n_2 = 1.6$ (abgeschätzt aus Abschnitt 5.1.1 und Literatur)
Mosaic spread S_{ms}	0.9	Literatur
Einfallswinkel θ	55°	Literatur und Abschnitt 5.1.1

Abb. 5.5 zeigt den so berechneten zeitlichen Verlauf des Winkels des Übergangsdipolmoments der Retinaldoppelbindung im Grundzustand. Im oberen Bereich ist der zeitliche Verlauf der Absorption bei 1527 cm^{-1} und p - bzw. s -polarisiertem Licht dargestellt. Es handelt sich um eine negative Bande des BR Grundzustandes, die mit Abstand die größte Bande im Spektrum ist, so dass der Einfluss von überlagerten Absorptionsänderungen gering sein sollte. Dies wird durch den konstanten Verlauf bestätigt: Lediglich im späten Zeitbereich oberhalb von 20 ms, wo die Absorptionen gegen Null gehen und der Fehler sehr groß wird, zeigen sich Abweichungen.

Ein zweites Beispiel zeigt Abb. 5.6 mit dem zeitlichen Verlauf der Orientierung bei 1200 cm^{-1} . Dabei handelt es sich im Wesentlichen um die Absorption der $\text{C}_{14}-\text{C}_{15}$ Retinaleinfachbindung [73]. Im Gegensatz zur Doppelbindung kann man hier die Absorption einer einzelnen Schwingung zuordnen. Im Vergleich zur vorherigen Abb. 5.5 ist aufgrund der geringeren Absorption in diesem Verlauf ein deutlich größeres Rauschen erkennbar.

Vergleicht man den gemessenen Wert von ca. 68° für die Orientierung der Retinaldoppelbindungen gegen die Membrannormale mit Literaturwerten [74, 75, 76, 77], so findet man eine gute Übereinstimmung: Im Übersichtsartikel von HEYN [74], der mit verschiedenen Methoden gemessene Retinalwinkel vergleicht, liegen

5 Ergebnisse und Diskussion

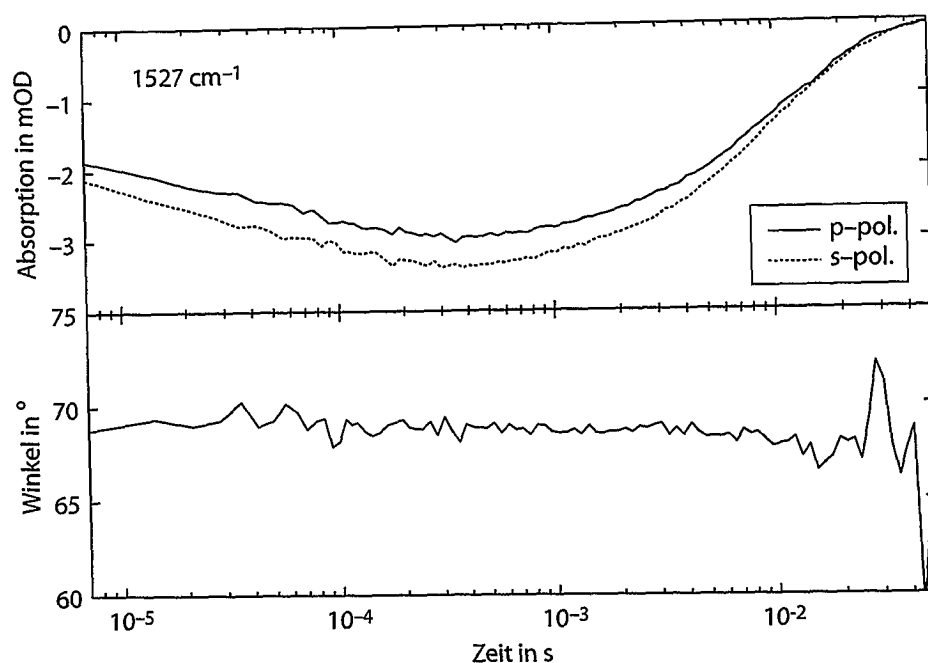


Abbildung 5.5 Zeitlicher Verlauf der Orientierung der Retinaldoppelbindung bei 1527 cm^{-1} . Der obere Teil zeigt die zugrunde liegenden Zeitverläufe der Absorptionen für p - und s -polarisiertes Licht, im unteren Teil ist der Winkelverlauf mit den im Text angegebenen Parametern berechnet. Wie erwartet ist der zeitliche Verlauf des Winkels konstant.

die Daten für die Polyenketten zwischen 65° und 70° . Zusätzlich zeigt z.B. [75] eine Tendenz der $C_{14}-C_{15}$ Einfachbindung zu etwas größeren Winkeln als bei den Doppelbindungen, was in unserem Fall durch einen Winkel in Abb. 5.6 von etwas über 70° bestätigt wird.

Dieser Vergleich zeigt, dass die Wahl der Parameter in der obigen Tabelle zur Bestimmung der Winkel durchaus plausible Ergebnisse liefert. Selbst im Vergleich mit Ergebnissen aus anderen Methoden wie Röntgenstrukturbestimmung und NMR ergeben sich ähnliche Werte. Damit ist die Aufnahme von *zeitaufgelösten* polarisierten Spektren und deren Umrechnung in Orientierungen prinzipiell zulässig und eine direkte zeitliche Beobachtung der Winkelveränderungen während des Photozyklus theoretisch durchführbar. Bei entsprechenden Versuchen stellt man allerdings schnell fest, dass gerade in diesen zeitaufgelösten Fällen die Überlagerung von Banden zum Problem wird: Leider ist nämlich in fast allen Fällen eine Winkeländerung auch mit einer Änderung der Absorptionsfrequenz verbunden. Die dicht gepackte Umgebung einer sich bewegenden Gruppe sorgt in diesem Fall für eine geänderte Schwingungskonformation, die sich in einer Verschiebung der Bande niederschlägt. In den meisten Fällen ist diese Verschiebung allerdings so klein, dass die neue Ban-

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

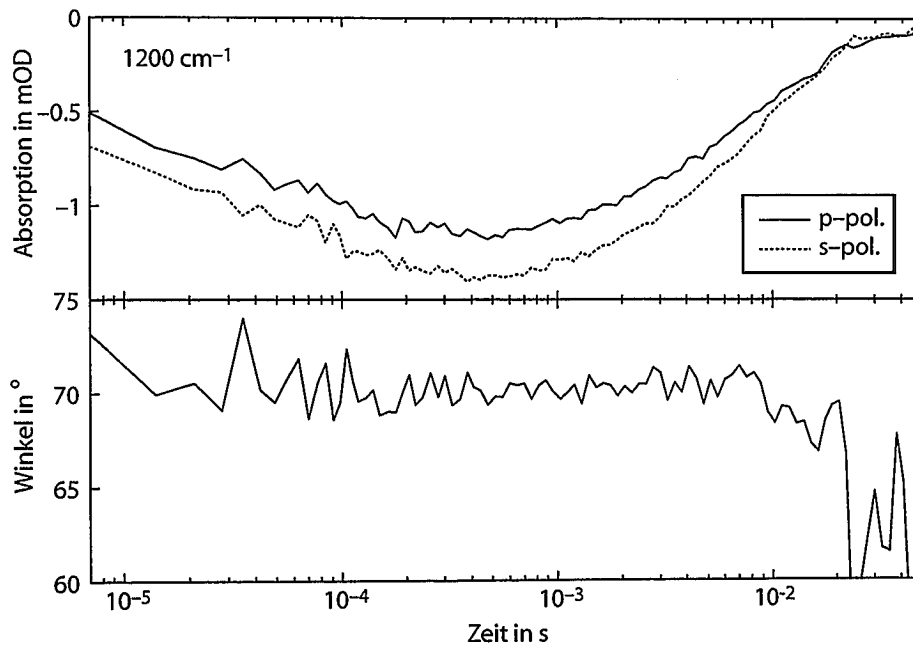


Abbildung 5.6 Zeitlicher Verlauf der Absorption der $C_{14}-C_{15}$ Retinaleinfachbindung. Im Gegensatz zur Retinaldoppelbindung, wo ein großer Teil der Polyenkette an der Schwingung beteiligt ist, trägt bei dieser Frequenz im Wesentlichen die $C_{14}-C_{15}$ Schwingung zur Absorption bei.

de mit der ursprünglichen überlagert. Ein gutes Beispiel für diesen Fall lässt sich in Abb. 5.4 ablesen: Die Asp 85 Bande bei — ursprünglich — 1760 cm^{-1} verschiebt sich durch Änderungen in der Umgebung zu kleineren Wellenzahlen. Bei einer späten Zeit ergibt sich also ein Gemisch aus Absorptionen bei 1760 cm^{-1} von Proteinen die noch im alten Zustand sind und Absorptionen bei 1753 cm^{-1} von Proteinen im neuen Zustand. Zur Trennung der Zustände und damit der Absorptionen ist es einerseits möglich, die Banden mit zwei Gauß- oder Lorentzfunktionen anzufitten und somit über die Bandenform, also spektrale Eigenschaften zu trennen. Dies ist sicherlich bei der Asp 85 Bande machbar, da diese oberhalb von 1700 cm^{-1} völlig isoliert liegt, in allen anderen Bereichen aber schwer möglich. Andererseits kann versucht werden, die Intermediate des Photozyklus aufgrund der kinetischen Eigenschaften zu trennen und somit reine Spektren zu erhalten, die nicht mit dem Protein in einem anderen Zustand überlagert sind. Eine solche Analyse wird im nächsten Abschnitt durchgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

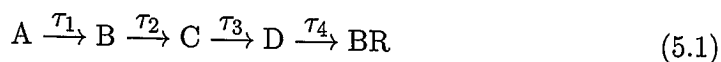
5.1.4 Trennung der Intermediate

Die Trennung der Intermediate soll aufgrund ihrer *kinetischen* Unterschiede mit möglichst wenigen Grundvoraussetzungen vorgenommen werden. Unabhängig von einem Reaktionsmodell werden im ersten Schritt die signifikanten Kinetiken analog zu Abschnitt 4.1.7 und dem Anhang A.3 durch eine Summe von Exponentialfunktionen angepasst. Darauf aufbauend kann dann mit der Annahme eines einfachen Modells die eigentliche Trennung erfolgen, dessen Güte mit Hilfe der bekannten Intermediatspektren beurteilt wird.

In diesem Fall wird — analog zur SVD-Analyse der polarisierten Daten — wieder eine einzige, kombinierte Matrix aus den beiden Einzeldatensätzen gebildet und alle Operationen auf der Frequenzachse *gemeinsam* durchgeführt. Wie aus Abb. 5.4 klar wurde, lassen sich die Daten mit drei signifikanten SVD-Komponenten rekonstruieren. Die Anpassung einer Summe von Exponentialfunktionen erfolgt somit auch lediglich an die Zeitspuren dieser Komponenten, die zusätzlich in der Zeit beschnitten wurden: Um das am Ende des Zyklus stark ansteigende Rauschen nicht ebenfalls anzufitten, wurden nur Daten bis 50 ms nach der Anregung berücksichtigt. Der erste aufgenommene Datenpunkt bei 7 μ s wurde ebenfalls weggelassen, da dessen Höhe durch die Anstiegszeit der Detektor/Vorverstärker-Kombination beeinflusst wird.

Das Ergebnis des Fits zeigt Abb. 5.7. Die Residuen im unteren Teil der Abbildung bestätigen, dass die Verwendung von vier Exponentialfunktionen ausreichend ist: Sie zeigen lediglich Rauschanteile⁷. Ein Fit mit nur drei Exponentialfunktionen dagegen zeigt in den Residuen deutliche, systematische Abweichungen (nicht gezeigt).

Eine solche Analyse mit der Anpassung einer Summe von Exponentialfunktionen an die Kinetiken ist unabhängig von einem Modell der tatsächlichen Intermediatzusammenhänge, also ohne Vorstellungen über Hin- und Rückreaktionen, Verzweigungen und Auslassungen, möglich, wenn man Reaktionen *erster* Ordnung zwischen den Intermediaten voraussetzt. Um eine wirkliche Trennung der Intermediate zu erreichen, ist allerdings die Annahme solch eines Modells nötig. Im Fall von BR wird im Folgenden ein sequentielles Modell benutzt:



Dabei wird davon ausgegangen, dass das Protein zum Zeitnullpunkt unmittelbar nach dem Laserblitz im Intermediat A vorliegt und dann über die obige Kaskade in den Grundzustand BR zurückkehrt. Die Annahme von vier Intermediaten ergibt

⁷Die zeitlichen Unterschiede in der Höhe des Rauschens ergeben sich daraus, dass zur Datenreduktion Punkte zu späten Zeitpunkten zusammengefasst wurden. Dementsprechend ist das Rauschen am Anfang recht hoch. Näheres dazu in Abschnitt 4.1.7 und im Anhang A.2. Hinzu kommen am Ende der Zeitaufnahme systematische Fehler durch elektronische Störquellen: Man erkennt z.B. eine leichte 50 Hz-Schwingung.

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

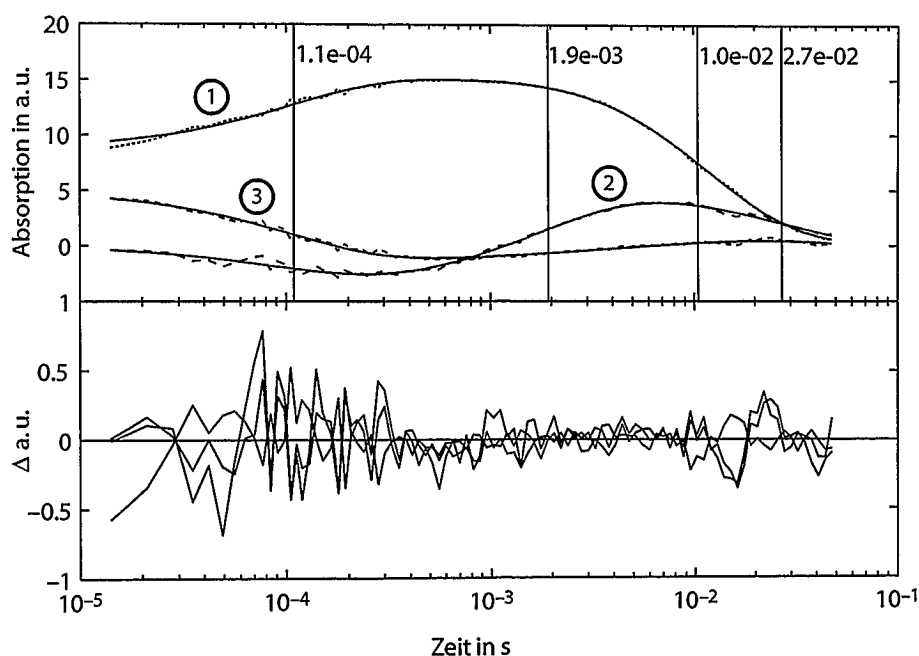


Abbildung 5.7 Fit der zeitlichen Komponenten der gemeinsamen SVD-Analyse der polarisierten Messungen an BR. Die SVD-Komponenten entsprechen im Wesentlichen denjenigen aus Abb. 5.4, mit Abweichungen, die sich aus den beschnittenen Datenpunkten in der Zeit ergeben. Die senkrechten Balken kennzeichnen die Lage der Zerfallskonstanten; der untere Teil der Abbildung gibt die Residuen, also die Differenz von gemessenen Daten und Verlauf des Fits wieder.

sich aus der benötigten Anzahl von Exponentialfunktionen zur Anpassung der Daten.

Legt man dieses Modell zu Grunde und berechnet damit den Konzentrationsverlauf der Intermediate⁸ so erhält man die Kurven in Abb. 5.8, wobei jeweils der *berechnete* Verlauf aus der Summe zweier Exponentialfunktionen und die entsprechende Zeitspur aus den Daten gezeigt wird. Mit Hilfe dieser Konzentrationsverläufe lässt sich ablesen, dass auch an den Zeitpunkten der jeweiligen Maxima der Intermediatkonzentrationen in den Messdaten immer Mischspektren aufgenommen werden. Beispielsweise enthält das gemessene Spektrum—immer die Gültigkeit des sequentiellen Verlaufs vorausgesetzt—bei 300 μ s, der maximalen Akkumulation des zweiten Intermediats, immer noch fast 20 % Beiträge des vorherigen und nachfolgenden Spektrums; 4 ms nach dem Laserblitz ist das Maximum des dritten Intermediats erreicht, wobei dieses Intermediat aber nur ca. 70 % des gemessenen

⁸ Der jeweilige Verlauf wird eindeutig gegeben durch die Zerfallskonstante des vorherigen Intermediats, die bei einer rein sequentiellen Reaktion auch den Aufbau des nachfolgenden Intermediats beschreibt, und dem Zerfall des Zustandes.

5 Ergebnisse und Diskussion

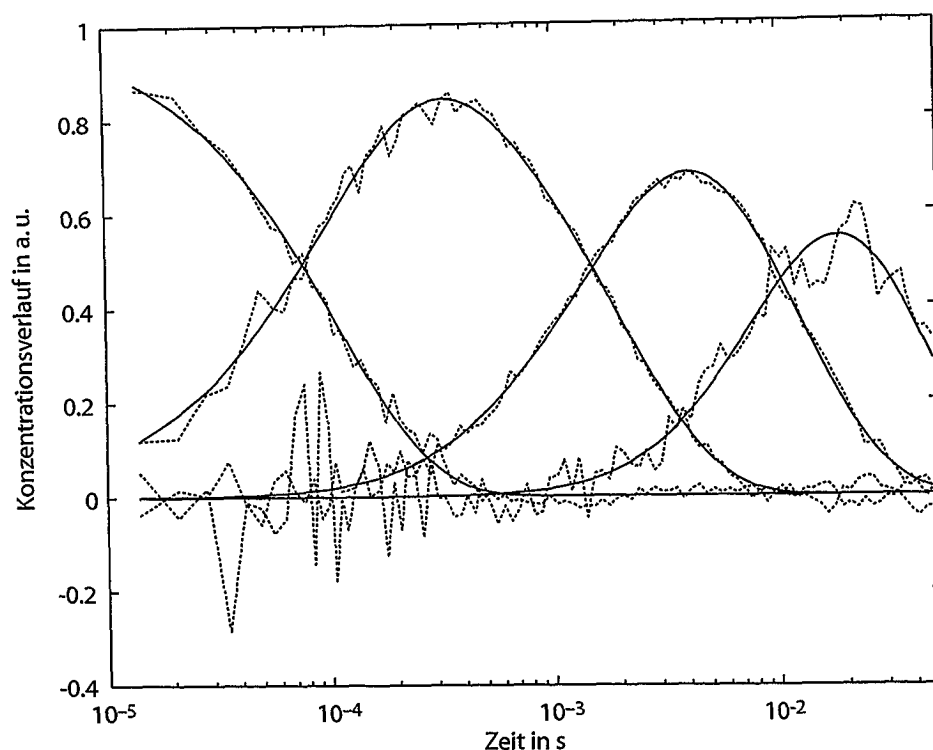


Abbildung 5.8 Konzentrationsverlauf der Komponenten eines sequentiellen Modells mit Reaktionen erster Ordnung. Die durchgezogenen Linien zeigen die gefitteten Verläufe, die gepunkteten Daten die entsprechenden rekonstruierten Verläufe aus den Messungen.

Spektrums zu diesem Zeitpunkt ausmacht.

Abb. 5.9 zeigt die zu diesen Konzentrationsverläufen gehörigen Spektren, die nach der Matrizenmanipulation wieder in die verschiedenen Polarisationsrichtungen getrennt wurden: Sieht man erst einmal von polarisationsbedingten Unterschieden ab und vergleicht die so gewonnenen Spektren mit Literaturwerten, z.B. in [59], so erkennt man die gute Übereinstimmung mit Spektren reiner Intermediate, die durch Variation der äußeren Parameter wie Temperatur und pH-Wert gewonnen wurden: Die Spektren der ersten Fitkomponente entsprechen den Absorptionen des Proteins im L-Intermediat. Typische Banden sind die positive Absorption bei 1189 cm^{-1} , das Maximum der kombinierten Amid I/Retinaldoppelbindungs-Bande bei 1548 cm^{-1} und das Fehlen der C=O-Doppelbindungsschwingung von Asp 85 bei 1760 . Stattdessen sieht man in diesem Bereich knapp über dem Rauschen kleinere Veränderungen zwischen 1750 cm^{-1} und 1730 cm^{-1} , die Änderungen in der Umgebung von Asp 96 und Asp 115 zugeschrieben werden. Allerdings deutet die nicht verschwundene HOOP-Mode bei 984 cm^{-1} auf Anteile von K hin, die in

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

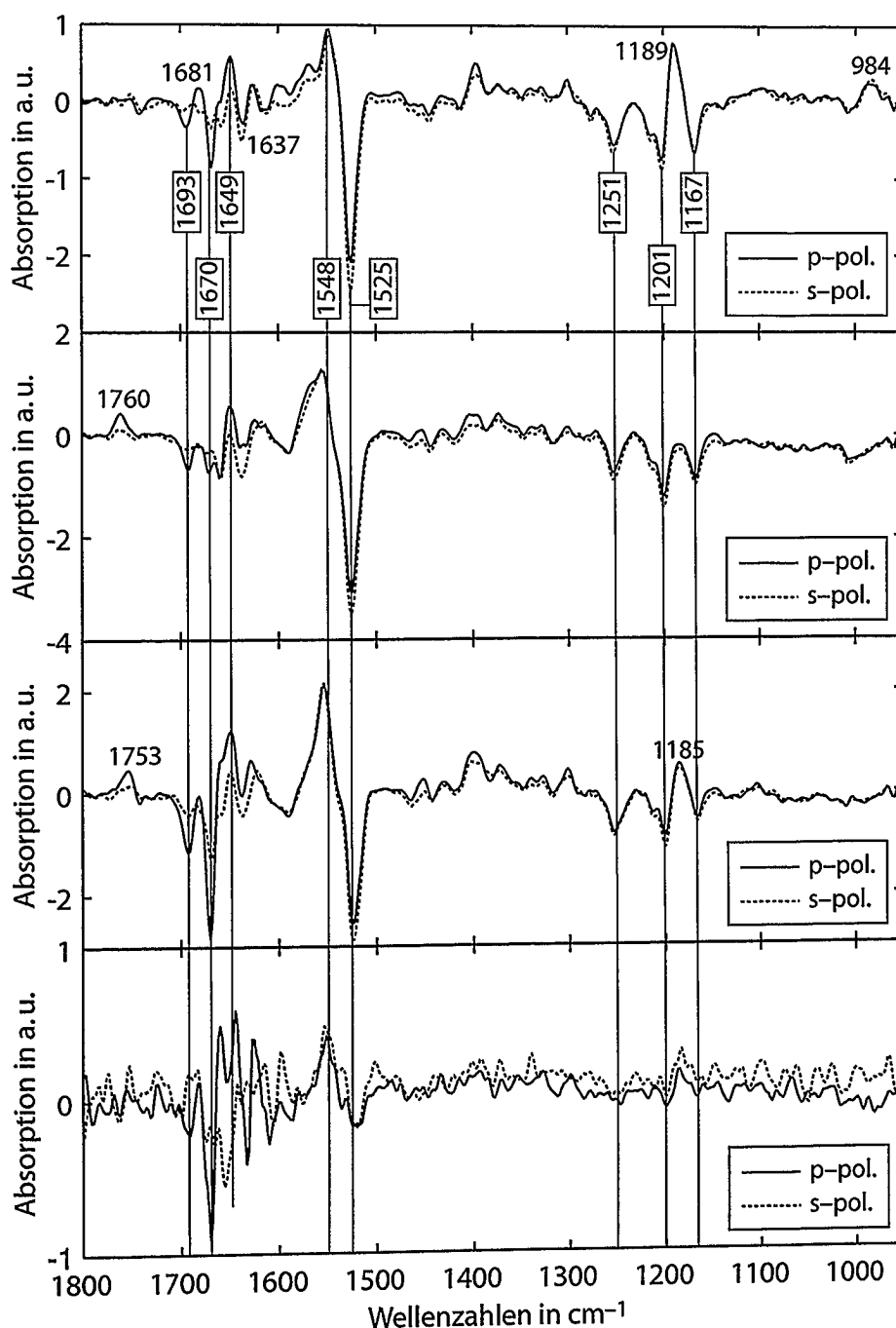


Abbildung 5.9 Die zu den Konzentrationsverläufen in Abb. 5.8 gehörenden Spektren der Komponenten in zeitlicher Reihenfolge. Es handelt sich hierbei um Differenzspektren der berechneten sequentiellen Intermediate zum Grundzustand. Analog zu den Spektren der SVD-Komponenten wurden die verschiedenen Polarisationsrichtungen wieder getrennt.

5 Ergebnisse und Diskussion

diesem sequentiellen Modell nicht getrennt werden können.

Die Spektren des zweiten berechneten Zwischenzustandes stellen ein typisches M-Intermediat dar: Die Absorption bei 1189 cm^{-1} , wo vorher und im nachfolgenden Intermediat eine positive Bande zu finden ist, hat einen minimalen Wert. Dies wird hervorgerufen durch die Abgabe des Protons der Schiffischen Base an Asp 85 und die entsprechenden Änderungen im Übergangsdipolmoment der C–C–Einfachschwingung. Analog taucht bei diesem Vorgang die C=O–Doppelbindung des Carboxylats bei 1760 cm^{-1} auf.

Im dritten Teil der Abbildung erkennt man Spektren des N-Intermediats, die sich durch die Verschiebung ebendieser Asp 85–Bande nach 1753 cm^{-1} und das erneute Auftauchen der Absorption um 1185 cm^{-1} durch die Reprotonierung der Schiffischen Base auszeichnen.

Die vierten Spektren scheinen keine spektralen Komponenten eines Intermediats darzustellen, sondern vollständig Rauschen zu repräsentieren. Dies ist um so erstaunlicher, als beim Fit der Zeitspuren der SVD-Komponenten am Anfang dieses Abschnitts (Abb. 5.7) vier Exponentialfunktionen zur Beschreibung nötig sind. Weniger als vier, wie durch diese Rauschkomponente nahegelegt, ergibt keinen adäquaten Fit. Allerdings ist schon der entsprechende Konzentrationsverlauf dieses letzten Intermediats in Abb. 5.8 erstaunlich, da am Ende des Photozyklus die Amplitude noch nicht auf Null zurückgekehrt ist. Dies und die fehlenden spektralen Elemente deuten darauf hin, dass dieses Intermediat für eine gute Anpassung von Exponentialfunktionen deshalb notwendig ist, um im Laufe der Zeit *größer* werdende Rausch- und Offsetfehler auszugleichen⁹. Im Gegensatz dazu kehren Proteinsignale wieder auf Null zurück, so dass diese unterschiedlichen zeitlichen Entwicklungen nicht in *einer* Komponente untergebracht werden können.

Um diese *zunehmenden* Störungen abzufangen, wird beim Anfitten einer Summe von Exponentialfunktionen oft¹⁰ ein konstanter Term hinzugefügt. Damit würde man sich hier eine *e*-Funktion sparen, hätte aber gleichwohl einen zusätzlichen Parameter eingeführt.

Insgesamt zeigt diese Zuordnung der nach einem sequentiellen Modell berechneten Intermediatspektren zu den bekannten Spektren des L-, M- und N-Intermediats, dass eine Trennung in diese drei detektierbaren Intermediate gerade mit Hilfe der polarisierten Messungen leicht möglich ist. Das Hinzufügen eines zusätzlichen Parameters, nämlich der Polarisationsrichtung, der genügend große Unterschiede in den Spektren verursacht, liefert zusätzliche Kriterien zur Trennung der Komponenten. Dies wird beispielsweise in den Spektren des N-Zustandes deutlich: Die Unterschiede im Amid I Bereich zwischen M-Intermediat und N-Intermediat sind die bei weitem größten Unterschiede zwischen den Zuständen und somit prädesti-

⁹ Wie die großen Amplituden zu Beginn des Photozyklus zeigen, werden zusätzlich auch noch Rauschkomponenten in den ersten Spektren in dieser Komponente aufgefangen.

¹⁰ und oft ohne es zu erwähnen...

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

Tabelle 5.1 Berechnung der Winkel der Retinalübergangsdipolmomente für die drei berechneten und zugeordneten Intermediate L, M und N des BR Photozyklus. Die Winkelberechnung geht von den Annahmen in Abschnitt 5.1.3 für den Brechungsindex, den Mosaikspread und den Einfallswinkel aus. Die zugeordneten C–C–Absorptionen entsprechen lediglich vorzugsweise der angegebenen Bindung.

		L	M	N
1525 cm ⁻¹	C=C	69.6°	68.8°	68.5°
1252 cm ⁻¹	C ₁₂ –C ₁₃	69.3°	70.5°	67.4°
1201 cm ⁻¹	C ₁₄ –C ₁₅	69.9°	69.6°	71.1°
1167 cm ⁻¹	C ₁₀ –C ₁₁	64.7°	68.7°	68.3°

niert, um zur Trennung benutzt zu werden.

Offensichtlich ist die Annahme eines sequentiellen Modells bei den hier benutzten Messungen und deren Signal/Rausch-Verhältnis erlaubt. Eine modellunabhängige Analyse z.B. nach [24] unter Umständen mit zusätzlichen Variationen in pH-Wert, Temperatur oder gemessenem Wellenlängenbereich wäre interessant, aber nur mit einem weiter verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis sinnvoll.

5.1.5 Analyse der polarisationsabhängigen Unterschiede

Retinalbanden des Grundzustandes

Zur grundlegenden Einordnung der Ergebnisse wird — wie in Abschnitt 5.1.3 — der Winkel der Retinalübergangsdipolmomente mit der Membrannormalen berechnet. Notwendige Bedingung für eine erfolgreiche Trennung der Intermediate ist es, dass die negativen Banden in den Differenzspektren, also im nicht überlagerten Fall die Banden des Grundzustandes von BR, einen konstanten Dichroismus in allen Intermediaten zeigen. Die entsprechenden, mit den Annahmen aus Abschnitt 5.1.3 berechneten Winkel für die drei zugeordneten Intermediate L, M und N finden sich in Tabelle 5.1. Offensichtlich ergeben sich bei einer Streuung zwischen 68° und 71° Werte, deren relative Abweichungen zwischen den einzelnen Intermediaten im Rahmen des Messfehlers liegen. Dieser ist wegen der dichten Anordnung der Absorptionsbanden auch nach der Trennung der Intermediate im Wesentlichen durch die Überlappung von Banden gegeben, bzw. bei kleineren Banden durch das Rauschsignal. Der systematische Fehler, der durch die Berechnung mit nicht exakt bekannten Parametern wie Einfallswinkel, Brechungsindex und mosaic spread entsteht, kann aber unter Umständen deutlich größer sein.

5 Ergebnisse und Diskussion

Des Weiteren fällt bei der Zuordnung der Schwingungsfrequenzen zu Übergangsdipolmomenten des Retinals (z.B. in Tab. 5.1) auf, dass die Unterschiede der Orientierung der Kohlenstoffeinfach- und Doppelbindung in der Tabelle nicht widergespiegelt werden. In der Grundzustandsstruktur z.B. von ESSEN et. al.¹¹ findet man Winkel der Doppelbindungen — am Ring beginnend — von 90°, 95°, 105° und 115°, bzw. da diese Schwingungen bei der Doppelbindung gekoppelt sind, für den Winkel der Verbindung C₇ bis C₁₅ mit der Normalen 72°. Dagegen lassen sich die drei Banden der Einfachschwingung eher jeweils einer einzelnen Bindung zuordnen [73], die in der Röntgenstruktur in aufsteigender Nummerierung Winkel von 40°, 50° und 60° liefern. Die im Gegensatz zur Doppelbindung starke Isolation der Schwingungsmoden auf einzelne Bindungen sind in der angegebenen Veröffentlichung durch isotoopenmarkierte Retinalderivate, die in Purpurmembran rekonstituiert wurden, gezeigt.

Damit zeigt dieses Beispiel eine weitere Fehlerquelle bei der leichtfertigen Zuordnung von Winkeln, die aus dichroitischen Verhältnissen berechnet werden, und der entsprechenden Orientierung einer Bindung: Gemessen wird im Infrarotspektrum ein *Übergangsdipolmoment*, das unter bestimmten Umständen (z.B. in einer solch regelmäßigen Struktur wie Retinal) deutlich von der Richtung der Bindung abweichen kann. Die elektronische Struktur der sich abwechselnden Doppel- und Einfachbindungen des Retinals lässt sich offenbar nicht isoliert betrachten und zwingt die Übergangsdipolmomente in diesem Fall in die Richtung, die durch das Retinal selber vorgegeben wird. Selbst der in den Grundstrukturen deutlich erkennbare Bogen, den das Retinal beschreibt (man vergleiche die oben genannten Winkel, die sich jeweils um ca. 10° verändern) wird im Übergangsdipolmoment nicht widergespiegelt. Wirklich genaue Aussagen über die Orientierung von Bindungen aus Infrarotdaten sind somit erst nach einer Analyse der Normalmoden und der elektronischen Struktur möglich.

Retinalbanden der Intermediate

Unter den im vorigen Abschnitt erläuterten Umständen und Fehlerquellen ist die Diskussion der weiteren Retinalbanden zu sehen: Die HOOP-Mode im L-Intermediat bei 984 cm⁻¹ hat eine apparente Orientierung von 72° gegenüber der Normalen. Da die Retinalstruktur (bei Annahme einer planaren Anordnung) senkrecht zur Retinalebene symmetrisch ist, sollte das Übergangsdipolmoment dieser Mode senkrecht auf der Ebene stehen und somit in L eine leichte Verkipfung der Ebene gegenüber der Normalen anzeigen. Nutzt man aber erneut die Daten der obigen Röntgenstruktur, so erkennt man, dass das Retinal schon im Grundzustand in ähnlichem Maße verdreht ist: Es ergeben sich Winkel¹² zwischen 107° und 73°, so

¹¹ PDB-Eintrag 1BRR

¹² Für die Berechnung wurde jeweils ein Triplet benachbarter Atome betrachtet, die gebildete Ebene und ihre Normale berechnet und der Winkel mit der Membrannormalen festgestellt und

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

dass mindestens ähnliche Werte im Nichtgleichgewicht zu erwarten sind.

Die positive Bande der C–C–Einfachbindung in L bei 1189 cm^{-1} und N bei 1185 cm^{-1} zeigt nominelle Winkel von 66° und 62° . Auch unter Beachtung des Signal/Rausch-Verhältnisses erscheinen diese Unterschiede zum Winkel des Retinals im Grundzustand als signifikant und könnten für eine in den Röntgenstrukturen des M-Intermediats [15, 28] gefundene Streckung des Retinals im Bereich zwischen C₁₀ und der Schiffischen Base stehen. Da diese Streckung durch die 13-*cis*, 15-*anti*-Isomerisierung zu Stande kommt, ist ihr Vorhandensein sowohl in L als auch in N wahrscheinlich. Nichtsdestotrotz sind Aussagen, die von der elektronischen Struktur des Retinals abhängen, recht spekulativ.

Leider handelt es sich um die einzige zugeordnete Retinalbande eines Intermediats, die im Hinblick auf die Richtung des Übergangsdipolmoments untersucht werden kann: Die Frequenz der C=C–Doppelbindung in den Zwischenzuständen überlagert mit Änderungen im Amid II Bereich des Proteins und kann davon kaum getrennt werden. Allerdings fällt im M-Intermediat die neu entstehende Schulter der positiven Bande bei ca. 1560 cm^{-1} auf, die einen deutlichen Dichroismus besitzt. In M ist durch die Deprotonierung der Schiffischen Base die Absorptionsfrequenz des Retinals zu höheren Frequenzen verschoben. Diese im sichtbaren Wellenlängenbereich deutlich erkennbare Verschiebung hat im Infraroten sein Analogon und bildet unter Umständen diese Schulter. Die Frequenz der Absorption wird mit Resonanz-Raman-Messungen bei 1566 cm^{-1} detektiert [78], was gut mit dieser Position übereinstimmt. Allerdings ist das Dipolmoment der Schiffischen Base in M durch die Deprotonierung deutlich verringert, so dass ein Nachweis eher unwahrscheinlich ist.

Die Absorption von Asp 85

Die Bande der Absorption von Asp 85 ist nach der Trennung der Intermediate nun in M und N ohne Beiträge des jeweils anderen Zwischenzustandes vorhanden. Die Analyse der Orientierung ergibt Winkel von 40° (M) bzw. 45° (N), so dass im Rahmen des relativen Fehlers (bei diesen kleinen Banden hauptsächlich durch das Rauschen gegeben) eine Umorientierung bezüglich der Normalen zwischen diesen beiden Intermediaten nicht festgestellt werden kann. Ein Vergleich des Winkels mit der Röntgenstruktur des Grundzustandes und des M-Intermediats von SASS *et. al.*¹³ ergibt folgende Werte: Für den Grundzustand erhält man 161° bzw. 73° , für M 132° bzw. 87° . Es sind jeweils zwei Werte angegeben, da sich die beiden in Frage kommenden Sauerstoffatome in der Röntgenstruktur nicht unterscheiden

dem mittleren Atom zugeordnet.

¹³ PDB-Eintrag 1CWQ

In diesem Fall wurde obige Struktur gewählt, um einen kompatiblen Datensatz von Grundzustand und M zu benutzen. Die weiter oben angegebenen Winkelberechnungen nach ESSEN stimmen im Wesentlichen mit dieser Grundzustandsstruktur überein.

5 Ergebnisse und Diskussion

lassen. Ein Winkel größer als 90° kommt durch die Verwendung einer *orientierten* Normalen zustande, die in diesem Fall in Pumprichtung des Proteins zeigt. Bei den Infrarotmessungen lässt sich dies nicht unterscheiden, so dass ein gemessener Winkel θ für θ oder $180^\circ - \theta$ stehen kann.

Wenn man beim Bild des *nach unten* pumpenden Proteins bleibt, dann verändert sich laut Röntgenstruktur die Anordnung der Sauerstoffe von Asp 85 in M so, dass die nach oben zeigende Bindung sehr stark kippt und die eher in der Membranebene liegende Bindung sich kaum verändert. Mit Hilfe der Infrarotmessungen lässt sich nun eine Zuordnung der beiden in Frage kommenden Bindungen an Asp 85 vornehmen: Der gemessene Wert von 40° in M kann zusätzlich für einen Winkel von 140° mit der orientierten Normalen stehen und stimmt damit sehr gut mit den 132° der Röntgenstruktur überein. Im Infraroten wird die Doppelbindung zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff detektiert, und damit die Bindung, die das Proton *nicht* aufgenommen hat. Damit koppelt das Proton erstaunlicherweise an dasjenige der beiden Sauerstoffatome an, dessen Bindung senkrecht zur Normalen steht und sich zwischen Grundzustand und M-Intermediat sowohl im Winkel ($\Delta\theta = 14^\circ$ gegen $\Delta\theta = 29^\circ$) als auch in der Position ($\Delta x = 0.5 \text{ \AA}$ gegen $\Delta x = 1.9 \text{ \AA}$) deutlich weniger verändert. Da die weiteren Winkeländerungen laut Infrarotmessungen beim Übergang nach N gering sind, ist eine große Positionsänderung der Protonenbindungsstelle auch in diesem Intermediat unwahrscheinlich und somit die relativ starke Verkippung von Asp 85 im Laufe des Photozyklus, die sich aber im Wesentlichen nur auf den passiven Sauerstoff auswirkt, für die Protonenleitung nicht unmittelbar notwendig.

Veränderungen im Bereich der Amid I Bande

Die Differenzbanden im Amid I Bereich, also zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} , sind im Gegensatz zu den Banden im entsprechenden Amid II Bereich¹⁴ nicht von den starken Absorptionsänderungen der C=C-Doppelbindung des Retinals überlagert. Andererseits ist, wie die Abbildungen in 5.9 zeigen, die Bandendichte in diesem Bereich so groß, dass — trotz der Auftrennung der Intermediate — die Banden stark überlappen. Eine ernst zu nehmende Winkelberechnung verbietet sich deshalb von vornherein. Dennoch ist dieser Bereich aufgrund der extremen Unterschiede zwischen den Polarisationsrichtungen und zwischen den Intermediaten untereinander sehr interessant. Wie bereits erwähnt ist dies gerade bei polarisationsabhängigen Messungen derjenige Teil der Spektren, der eine Auftrennung der Intermediate sehr leicht macht.

Die drei prominentesten Banden in allen drei Intermediatspektren finden sich bei 1693 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} und 1649 cm^{-1} . Der starke Dichroismus — alle drei Ban-

¹⁴ Das Proteinerückgrat erzeugt sowohl eine Bande im Amid I Bereich als auch im Amid II Bereich; Differenzbanden durch Veränderungen des Gerüsts in ersterem sollten prinzipiell von entsprechenden Differenzbanden in letzterem begleitet sein.

5.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie zur Messung des Lineardichroismus von BR

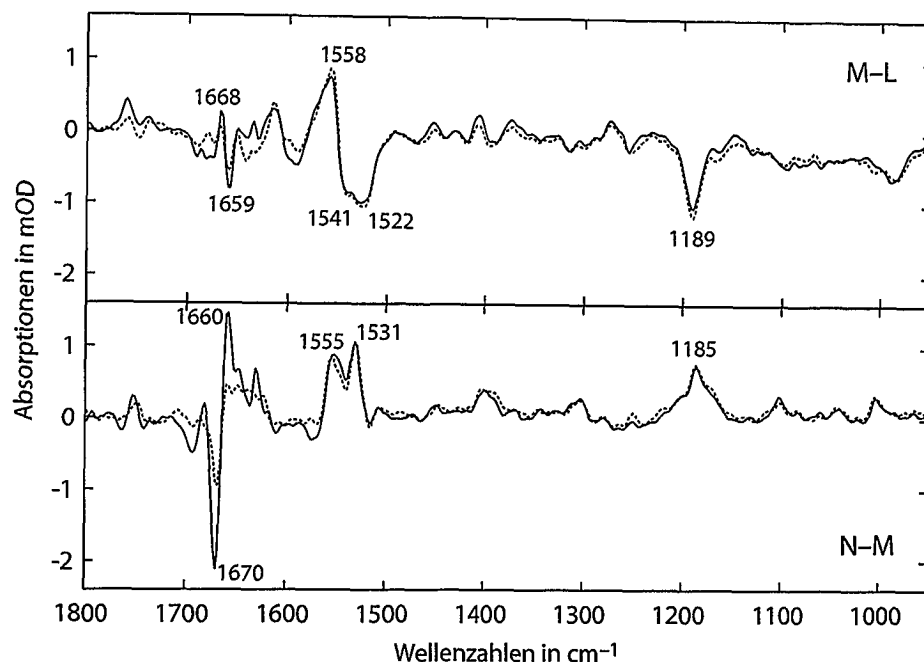


Abbildung 5.10 Doppeldifferenzspektren M–L (oben) und N–M (unten), die sich aus den Differenzspektren zum Grundzustand aus Abb. 5.9 berechnen lassen. Man erhält somit die Veränderungen zwischen den Intermediaten unabhängig vom Spektrum des Grundzustandes.

den sind mit *p*-polarisiertem Licht deutlich besser detektierbar — belegt, dass die entsprechenden Übergangsdipolmomente vorzugsweise parallel zur Membrannormalen liegen. Im Zusammenhang mit den entsprechenden Frequenzen ist demnach die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um Amid I Banden von Aminosäuren in einer α -Helix handelt, sehr hoch.

Um die Zeitentwicklung dieser Banden aufzuzeigen und die Unterschiede zwischen den Intermediaten zu analysieren, sind in Abb. 5.10 die Doppeldifferenzspektren gebildet worden: Die in Abb. 5.9 gezeigten Differenzspektren der Intermediate zum Grundzustand wurden nach

$$(M - BR) - (L - BR) = M - L$$

$$(N - BR) - (M - BR) = N - M$$

zu Differenzspektren der Intermediate untereinander umgerechnet, um die Veränderungen während des Photozyklus unabhängig vom Grundzustand verfolgen zu können. Eine Skalierung der Spektren aufeinander ist nicht nötig, da es sich bei den entsprechenden Zeitverläufe in Abb. 5.8 um echte Konzentrationverläufe handelt und somit ihre Summe die Rückkehrkinetik zu BR darstellt.

5 Ergebnisse und Diskussion

Auf gleicher Ordinate lässt sich die Größe der Änderungen zwischen L und M (oben) bzw. zwischen M und N (unten) gut vergleichen. In Zusammenhang mit den in den vorigen Abschnitten besprochenen Banden fällt auf, dass in dieser Darstellung die aufgesplittete Struktur der Retinaldoppelbindungsabsorption deutlich wird, wie sie in den Raman-Absolutspektren der Intermediate L und N zu finden sind [78, 79, 80]. Vor allem der Doppelpeak im N–M-Spektrum zeigt Frequenzen, die sich gut den entsprechenden Ramanbanden der obigen Literatur zuordnen lassen, obwohl die Strukturänderungen der Amid II Bande überlagert sind. Die negativ zu erwartende M-Bande verschwindet offenbar unter den beiden positiven Peaks, da ihr Dipolmoment durch Abgabe des Protons stark verringert ist.

Dominierendes Element im Differenzspektrum der beiden letzten Photozyklus-intermediate ist aber der Bereich der Amid I Bande: Man erkennt sehr starke Änderungen beim Übergang von M nach N, die sich in dieser Darstellung als im Wesentlichen auf die Bandenkombination $1670\text{ cm}^{-1}/1660\text{ cm}^{-1}$ zurückführen lässt. Die sehr eng beieinander liegende Kombination aus einer negativen und einer positiven Bande, die zeitgleich entstehen, deutet darauf hin, dass es sich um eine Verschiebende handelt: Sowohl der negative als auch der positive Teil der Bande wird von ein und derselben Absorption hervorgerufen, deren Frequenz sich nur minimal ändern muss. Einer Verschiebende mit Maxima bei 1670 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} liegt eine Absorption zugrunde, deren Frequenz sowohl vorher als auch nachher *zwischen* diesen beiden Frequenzen liegt. Am Ehesten wird diese Bandenkombination somit von einer relativ großen Absorption hervorgerufen, deren Absorptionsfrequenz sich nur sehr leicht ändert und die sich zusätzlich durch einen starken Dichroismus auszeichnet; wie bereits angedeutet spricht dies stark für die Amid I Absorption einer α -Helix parallel zur Membrannormalen, die sich bewegt und aufgrund der Umgebungsänderung die Absorptionsfrequenz leicht verschiebt.

Solche leichten Konformationsänderungen der α -Helices stützen die Theorie, dass zur Reprotonierung von Asp 96 — dem Protonendonator der Schiffischen Base beim Übergang von M zu N — das Öffnen von Kanälen zum schnellen Protonentransport notwendig ist. Rein thermische Fluktuationen zwischen den im extrazellulären Bereich von BR nur spärlich verteilt liegenden Carboxylaten reichen dafür offensichtlich nicht aus. Allerdings zeigt sowohl die extrem geringe Änderung der Absorptionsfrequenz als auch die geringe Halbwertsbreite der Bande, dass die strukturellen Änderungen nicht besonders groß sein müssen. Dennoch kann prinzipiell bei der Verwendung von Differenzspektren die *totale* Absorption der beteiligten Gruppen nicht ermittelt werden und unter Umständen um ein Vielfaches größer sein als die Differenzbanden. Eine Abschätzung der Anzahl der beteiligten Aminosäuren wie z.B. in [81], wo ca. 10 Aminosäuren berechnet werden, ist aus diesem Grunde gewagt.

In den Differenzspektren zum Grundzustand von Abb. 5.9 fällt zusätzlich auf, dass die Bandenkombination $1670\text{ cm}^{-1}(-)/1660\text{ cm}^{-1}(+)$ wie gerade besprochen

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

in N extrem groß ist, in L allerdings mit deutlich geringerer Höhe als Schulter zwischen $1670\text{ cm}^{-1}(-)$ und $1649\text{ cm}^{-1}(+)$ bereits erkennbar ist. Auch die Doppeldifferenzen zeigen dies durch kleinere, komplementäre Änderungen in M–L, die dadurch entstehen, dass im M–Intermediat bei 1660 cm^{-1} eine starke *negative* Bande vorhanden ist. Diese kuriose Zeitentwicklung deutet darauf hin, dass es sich nicht um eine einzige Gruppe handelt, die diese Bandenkombinationen hervorruft, so dass eine Zuordnung ohne weitere markierende Techniken wohl schwer möglich sein wird.

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

Bei einer Chloridpumpe wie Halorhodopsin ist es in Analogie zu Bacteriorhodopsin verständlich, dass der Photozyklus stark von der Konzentration der zu pumpenden Ionen abhängt. Bei BR lässt sich z.B. das O–Intermediat durch die Verwendung eines tiefen pH–Wertes anreichern und damit im Zeitverlauf erst sichtbar machen. Die große Anzahl an Protonen im umgebenden Medium kann die Abgabe des gepumpten Protons zeitlich verzögern und somit stark in die kinetischen Vorgänge eingreifen.

Die in Abb. 5.11 gezeigten Absorptionsspektren von HR im UV/VIS bei zwei verschiedenen Chloridkonzentrationen allerdings zeigen, dass bereits im Grundzustand von HR starke Abhängigkeiten von der Pumpionenkonzentration bestehen: Die Bande bei ca. 580 nm wird durch die Retinalabsorption hervorgerufen und zeigt deutliche Unterschiede zwischen 0 M Cl^- und 5 M Cl^- , während der Peak durch Cytochromverunreinigungen bei etwas über 400 nm fast unverändert bleibt. Die Bande unterhalb von 300 nm zeigt Aromatenabsorptionen und diente der Skalierung, um unterschiedliche Proteinkonzentrationen auszugleichen. Offenbar sind die Chloridionen in der Lage, die Umgebung oder die Konformation des Retinals so zu beeinflussen, dass sich dessen Absorption signifikant ändert.

Da diese Veränderungen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Veränderungen in unmittelbarer Nähe des Retinals hervorgerufen werden, ist die Annahme von Chloridbindestellen in diesem Bereich, die je nach Konzentration im umgebenden Medium besetzt oder verlassen werden, plausibel. Bestätigt wird dies durch die Kristallstruktur von HR [42], in der sich eine Chloridbindestelle zwischen Lys 242 und der Schiffchen Base befindet. Es ist zumindest fraglich, ob diese Stelle in 100 % der Proteine im Kristall besetzt ist, und ob andere, weniger gut definierte Chloridionen im Bereich des Retinals ausgeschlossen werden können. Unterschiedliche Besetzungszahlen je nach Chloridkonzentration entsprechen dem zweiten obigen Fall, so dass *a priori* zumindest im Grundzustand von einem HR–Gemisch in verschiedenen Zuständen ausgegangen werden muss. Inwieweit die einzelnen Bestandteile am Photozyklus teilnehmen ist ungewiss. Des Weiteren treten je nach Lichtadaptation unterschiedliche Anteile von Retinalkonfigurationen auf: Das laut

5 Ergebnisse und Diskussion

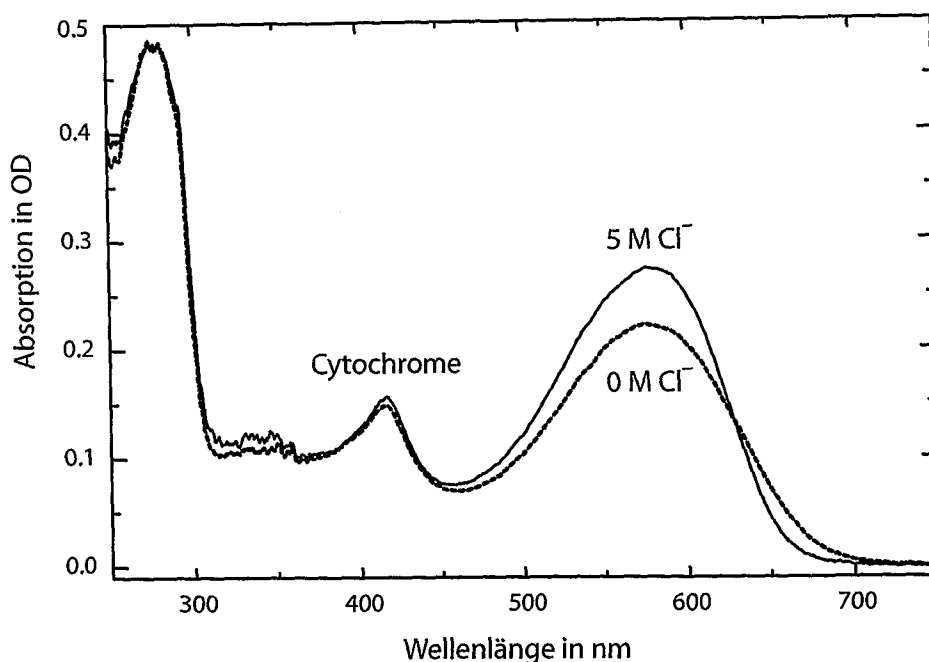


Abbildung 5.11 Absorptionsspektren von Halorhodopsin im UV/VIS mit bzw. ohne Chlorid. Die chloridabhängige Bande bei ca. 580 nm wird durch die Retinalabsorption hervorgerufen; die Bande bei 415 nm zeigt Absorptionen von Cytochromen, die die Probe verunreinigen.

Literatur [82, 83, 44] bei einer lichtadaptierten Probe zwischen 60 % und 85 % vorliegende Protein mit all-*trans* Retinal zeigt einen Photozyklus, der sich im UV/VIS deutlich vom Photozyklus des in komplementären Anteilen vorliegenden 13-*cis* Retinalproteins unterscheidet [44]. Eine Lichtadaptation zu 100 % in den chloridpumpenden und damit hier relevanten all-*trans* Zustand [82] wie bei BR ist nicht möglich.

5.2.1 Präparation und Messdurchführung

Für die Messungen wurde Halorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* (Stamm L33) überexprimiert [84] und die Membranfragmente mehrmals in destilliertem Wasser gewaschen. In gelöster Form mit einer Proteinkonzentration von ca. 2 mg/ml wurden diese Fragmente auf dem ATR-Kristall eingetrocknet und anschließend mit einer Pufferlösung (10 mM P₄O₇; pH 6) und unten angegebener Konzentration an NaCl rehydratisiert.

Aufgrund der starken spektralen Unterschiede bereits im UV/VIS sind zu einer umfassenden Beschreibung des Photozyklus im Infraroten chloridabhängige

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

Messungen unumgänglich. Allerdings ist die definierte Einstellung von Ionenkonzentrationen bei der Verwendung von Standardtransmissionszellen in der IR-Spektroskopie praktisch unmöglich, da die essentiell geringe Weglänge des IR-Strahls durch die Zelle (im Bereich einiger Mikrometer) nur leicht angefeuchtete Proben zulässt. Die Verwendung der in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen ATR-Zelle umgeht diese Probleme und ermöglicht eine komfortable und reproduzierbare Einstellung der Ionenstärke. Da allerdings bei der benutzten Methode der Herstellung eines Protein/Membran-Filmes auf der Oberfläche des Diamanten und anschließender Rehydratisierung eine gewisse Menge Salz in der Lösung vorhanden sein muss, um ein Ablösen des Films zu verhindern, wurde bei geringen Chloridkonzentrationen ein Füllsalz (KNO_3) verwendet¹⁵. Eine minimale Salzkonzentration von 1 mol/l wurde so erreicht, wobei im Fall der Messungen *ohne* Chlorid der eingetrocknete Film unter 100 % Luftfeuchtigkeit auf dem ATR-Kristall rehydratisiert wurde, um für diese Messungen nicht auf einen Transmissionsaufbau umsteigen zu müssen.

Wie bereits im methodischen Teil (Abschnitt 4.1) beschrieben, sind die Differenzsignale der Messungen mit Halorhodopsin im Infraroten mindestens um eine Größenordnung kleiner als bei Bacteriorhodopsin. Damit bewegt sich die relative Änderung der größten Signale im Promille-Bereich und dementsprechend die eher kleinen Banden im Bereich der Bitauflösung des Analog/Digital-Wandlers. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurde deshalb im folgenden bei den meisten Chloridkonzentrationen AC-gekoppelt gemessen, um die Anzahl der notwendigen Messungen zur Mittelung relativ klein zu halten. Zur Auswertung stehen so Messungen bei sieben verschiedenen Chloridkonzentration von 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 mol/l zur Verfügung. Lediglich bei 0, 3 und 5 mol/l wurden zusätzlich aufwendige DC-Messungen durchgeführt.

Als Folge der unterschiedlichen Salzkonzentrationen und des nicht immer reproduzierbar herstellbaren Umsatzes an Protein in den Photozyklus, erhält man unterschiedlich hohe Proteinsignale, die zum besseren Vergleich aufeinander skaliert werden müssen. In den folgenden Titrationsdaten wurde dies anhand der L-Bande bei 1188 cm^{-1} durchgeführt. Unter der Voraussetzung, dass dieser Zustand bei allen Chloridkonzentrationen früher oder später von unserem erfassten Zeitbereich beobachtbar durchlaufen wird, ist dessen Höhe ein gutes Maß für den erfassten Umsatz.

5.2.2 Infrarotabsorptionen von HR

In Abb. 5.12 findet man ein typisches Infrarotdifferenzspektrum, welches bei 3 M Cl^- und 1 ms nach dem laserinduzierten Start des Photozyklus aufgenommen wurde. Zur Bandenzuordnung findet man im unteren Teil der Abbildung ein Ramanpektrum des Grundzustandes, welches mit einer Anregungswellenlänge von

¹⁵ Nitrat wird bei *Halobacterium salinarum* nur zu einem Bruchteil des Umsatzes von Chloridionen gepumpt

5 Ergebnisse und Diskussion

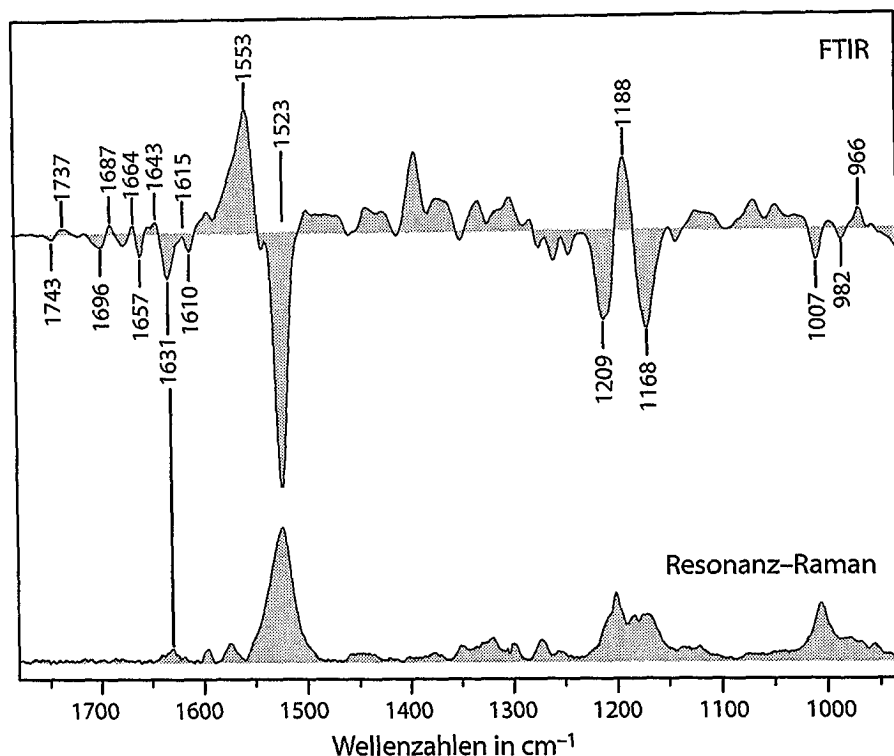


Abbildung 5.12 Repräsentatives Differenzspektrum des L-Intermediates von HR, wie es durch zeitauflösende Infrarotspektroskopie aufgenommen wurde, im Vergleich mit einer Resonanz-Raman-Messung bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm (siehe Abschnitt 5.3.2). Im Gegensatz zu den FTIR-Daten zeigt die Ramanmessung nur resonanzverstärkte Banden des Retinals und ermöglicht somit eine vereinfachte Bandenzuordnung.

752 nm mit der Durchflusszelle aufgenommen wurde. Bei dieser Wellenlänge ist man weit genug von der Absorptionsfrequenz des Retinals entfernt, um die Photokonversion klein zu halten, andererseits ist man energetisch nah genug, um den Resonanzeffekt hervorzurufen. Somit werden nur Banden des Retinals und seiner Umgebung im Grundzustand detektiert.

Das gewählte Infrarotspektrum ist qualitativ sehr ähnlich zu einem BR-Spektrum im L-Intermediat (siehe Abb. 5.9, Seite 69): Man erkennt die Absorption der C=C-Doppelbindung des Retinals im Grundzustand bei 1523 cm^{-1} , im Intermediat im Bereich von 1553 cm^{-1} überlagert von den Banden der Amid II Veränderungen. Auch die Region der C-C-Einfachbindungen ist — vom Fehlen des linken Teils des negativen Dreizacks abgesehen — analog zu BR im L-Intermediat mit einer sehr guten Übereinstimmung der Frequenz bei 1188 cm^{-1} . Die geringen

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

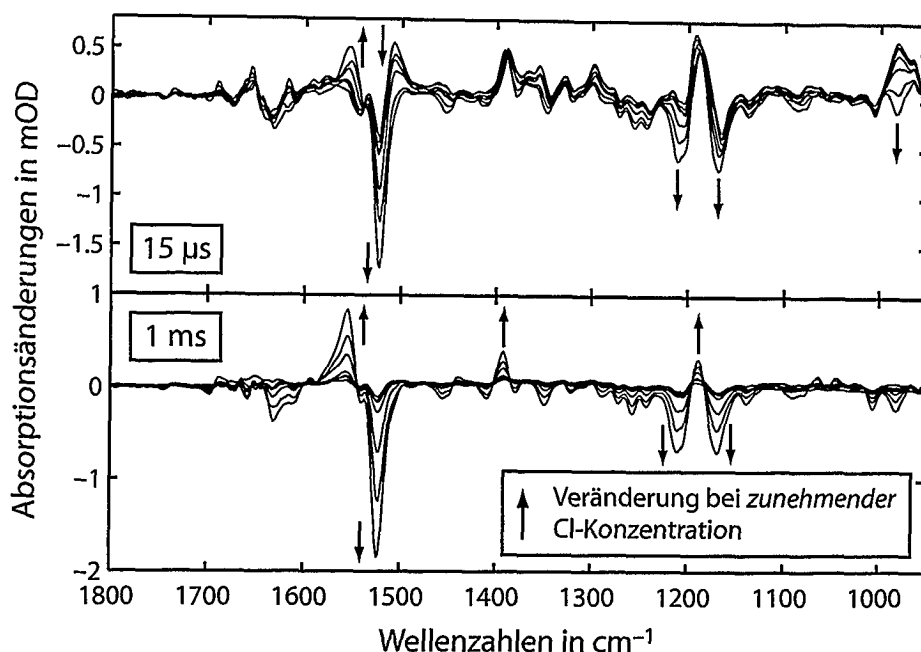


Abbildung 5.13 Titrationspektren von HR aus zeitaufgelösten Messungen. Die gezeigten Spektren wurden 15 µs (oben) bzw. 1 ms (unten) nach dem Laserblitz aufgenommen. Die Pfeile markieren die Entwicklung der Banden bei zunehmender Chloridkonzentration von 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, und 5 mol/l.

Veränderungen im Amid I Bereich (zu diesem Zeitpunkt sind offensichtlich keine strukturellen Veränderungen am Proteinrückgrat aufgetreten) lassen des Weiteren die Zuordnung einer negativen Bande bei 1631 cm^{-1} zur Absorption der Schiff-schen Base im Grundzustand zu. Offenbar gibt es in diesem Bereich deutliche Umgebungsveränderungen.

5.2.3 Messungen mit AC-Kopplung

Die zeitaufgelösten Messungen mit AC-Kopplung wurden bei sieben verschiedenen Chloridkonzentrationen durchgeführt. Einen Überblick über die entsprechenden Messungen mit drei Parametern¹⁶ liefert Abb. 5.13, wo die Chloridabhängigkeit bei zwei verschiedenen Zeitpunkten im Photozyklus dargestellt ist. Im oberen Teil werden die bei der benutzten Zeitauflösung frühesten Spektren im Bereich von 15 µs dargestellt, im unteren Teil sieht man die Entwicklung bei 1 ms, wo laut Literatur

¹⁶ Wellenzahl, Zeit und Konzentration: Eine übersichtliche Darstellung, die schon bei zwei Parametern schwierig ist, ist hier unmöglich.

5 Ergebnisse und Diskussion

das aus der vorigen Abbildung bekannte L-Spektrum dominierend sein soll [44]¹⁷. Die Pfeile kennzeichnen die Entwicklung ausgewählter Bereiche für 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 und 5 mol/l Cl⁻-Ionen.

Die Spektren nach 15 μ s zeigen bei geringer Chloridkonzentration deutliche Zeichen eines K-Intermediates: Die positive Bande der C=C-Absorption bei 1508 cm⁻¹ entspricht im UV/VIS einer Rotverschiebung wie in K; die großen Banden der HOOP-Moden bei 981 cm⁻¹ und 965 cm⁻¹ sind ebenfalls typisch für dieses frühe Intermediat. Bei ansteigender Chloridkonzentration verschwinden diese Merkmale allerdings und das Spektrum zeigt mehr und mehr Merkmale eines L-Intermediates.

Die Entwicklung bei den 1 ms-Spektren, die unabhängig von der Konzentration an Chloridionen ein L-Intermediat anzeigen, sieht dagegen nach einer einfachen Skalierung aus: Das Intermediat wird mit steigender Konzentration zu diesem Zeitpunkt stärker angereichert.

Um die Chloridabhängigkeit auch quantitativ besser darstellen zu können, wurden diese Spektren jeweils einer SVD-Analyse unterzogen, die in diesem Fall — im Gegensatz zu den Analysen der normalen zeitaufgelösten Messungen — als zweite Achse eine Konzentration liefern. Die entsprechenden Zerlegungen finden sich in Abb. 5.14 und 5.15: Die 15 μ s Messungen zeigen in erster Näherung zwei signifikante Komponenten, die sich grob den beiden Intermediaten K und L zuordnen lassen, obwohl die SVD-Zerlegung in keiner Weise einen Anspruch auf eine „biologische“ Zerlegung der Spektren hat. Allerdings kann folgendes geschlossen werden:

- Aufgrund der *zwei* signifikanten Komponenten sind mindestens zwei Intermediate notwendig, deren Mischung bei einer bestimmten Konzentration das gemessene Spektrum rekonstruiert. Falls die Intermediatspektren linear abhängig sind, so ist eine Anzahl größer als 2 möglich; mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich aber um *genau* zwei Intermediate.
- Die berechneten Komponenten auf spektraler Ebene sind wahrscheinlich nicht die Intermediatspektren, da sie — eher artifiziell — senkrecht zueinander stehen (komponentenweise Multiplikation und anschließende Addition der Resultate liefert Null). Allerdings lassen sich beide Intermediatspektren als Linearkombination aus den SVD-Komponenten erzeugen.
- Analog zum vorherigen Punkt gilt für die Konzentrationskinetiken: Die beiden Chloridverläufe der Intermediatspektren lassen sich durch Linearkombination der beiden SVD-Verläufe erzeugen.

Da für die echten Intermediatspektren kaum andere als eine Art K und eine Art L in Frage kommen, so ergibt sich für diese beiden eine Konzentrationskinetik, die

¹⁷ Die im Wesentlichen auf zeitaufgelösten Daten im UV/VIS fußende Zuordnung der Intermediate und deren Übertragbarkeit auf den infraroten Wellenlängenbereich beruht auf der Annahme gleicher Probenbedingungen. Dementsprechend wurden die Retinalkinetiken von UV/VIS und FTIR in unserem Labor verglichen und auf ähnliche Zeitkonstanten hin überprüft.

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

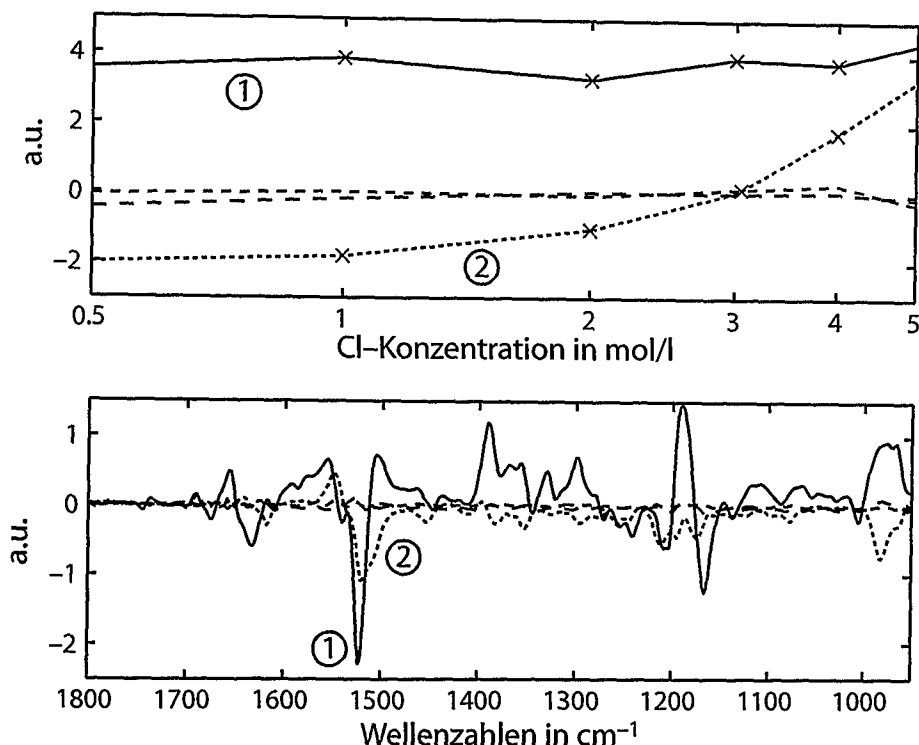


Abbildung 5.14 SVD-Analyse der *frühen* Titrationsspektren aus Abb. 5.13. Im Gegensatz zu den SVD-Analysen von BR im Abschnitt 5.1 wird hier keine Zeitachse sondern eine Achse der Chloridkonzentration als zweite Dimension genutzt.

sich jeweils aus einer Linearkombination der SVD-Verläufe zusammensetzt. Da die erste Komponente fast unabhängig von der Chloridkonzentration ist, wird also in beiden Fällen die Veränderung durch die zweite Komponente gegeben. Desweiteren liegt es nahe, von einem gegenläufigen Verlauf auszugehen, so dass ein Spektrum auf Kosten des anderen erscheint und diese Veränderungen aufgrund der komplementären Kinetiken die gleiche Ursache haben.

Abb. 5.15 zeigt in einer hier ausreichenden Näherung eine einzige signifikante Komponente, die sich ähnlich zum Verlauf der zweiten Komponente der vorherigen SVD-Zerlegung verhält. Sie beschreibt die bereits festgestellte verstärkte Akkumulation des Intermediates bei steigender Chloridkonzentration. Im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses handelt es sich hier um ein klares L-Intermediat.

Die Entwicklung der Spektren in Abhängigkeit der Chloridkonzentration zeigt, dass in beiden Fällen bis in den Bereich von 5 mol/l eine starke Abhängigkeit der Kinetik von der Anzahl der Chloridionen besteht, wobei in der Literatur davon ausgegangen wird, dass oberhalb von 3 mol/l Änderungen nicht mehr auftreten. Eine entsprechende reproduzierbare Einstellung der Konzentration für Infrarot-

5 Ergebnisse und Diskussion

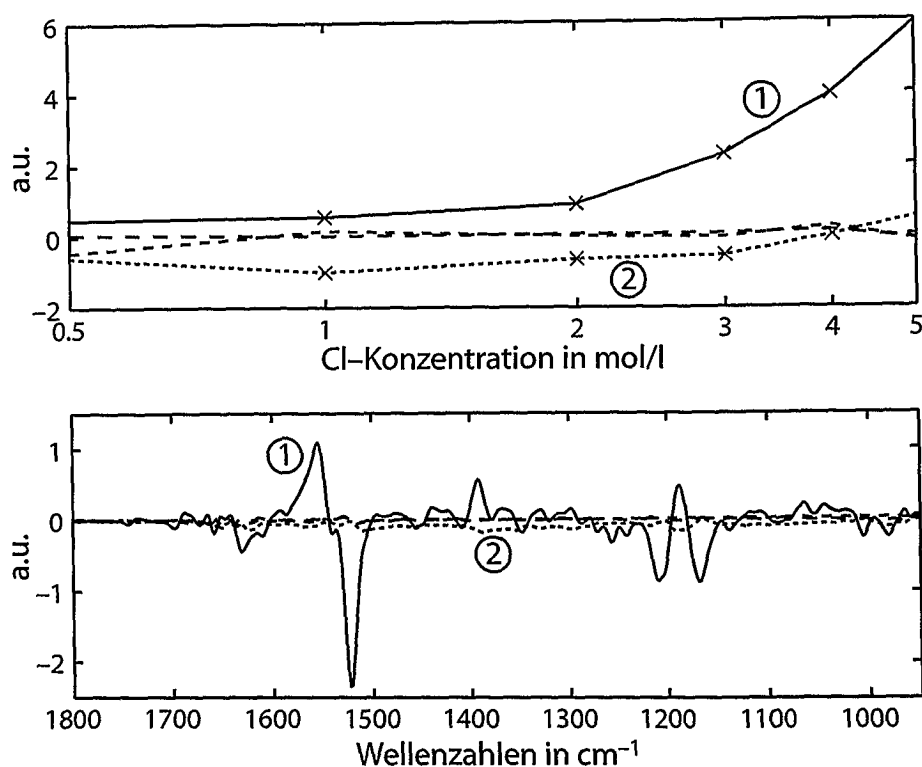


Abbildung 5.15 Analog zu Abb. 5.14 die SVD-Analyse der *späten* Differenzspektren von HR im Bereich von 1 ms nach dem Laserblitz in Abhängigkeit der Chloridkonzentration.

messungen ist allerdings nur mit der ATR-Technik möglich, zumal der Bereich von 5 mol/l an der Grenze der Chloridlöslichkeit liegt.

5.2.4 Messungen mit DC-Kopplung

Die obigen Messungen wurden in AC-Kopplung durchgeführt, um die Messdauer bei der großen Anzahl an Konzentrationen in Grenzen zu halten. Dies begrenzt den nutzbaren Zeitbereich auf unter 1 bis 2 ms. Eine kinetische Analyse ist deshalb mit diesen Daten nicht möglich; parallel wurden deshalb für 0 mol/l, 3 mol/l und 5 mol/l DC-gekoppelte Daten aufgenommen¹⁸, die einen Vergleich der Kinetiken auch zu späten Zeiten erlaubt. Analog zur Analyse der zeitaufgelösten polarisierten Messungen an BR (siehe Abschnitt 5.1.4 auf Seite 66) wurden die Kinetiken mit Hilfe der SVD-Zerlegung angepasst und mit einem sequentiellen

¹⁸ Zum Vergleich des Signal/Rausch-Verhältnisses der beiden Messmethoden: Bei den AC-Messungen mit 5 M Chlorid wurden 3 Einzelmessungen gemittelt, bei den DC-gekoppelten dagegen 32 mit vergleichbarem Zeitaufwand von ca. einer Stunde pro Einzelmessung.

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

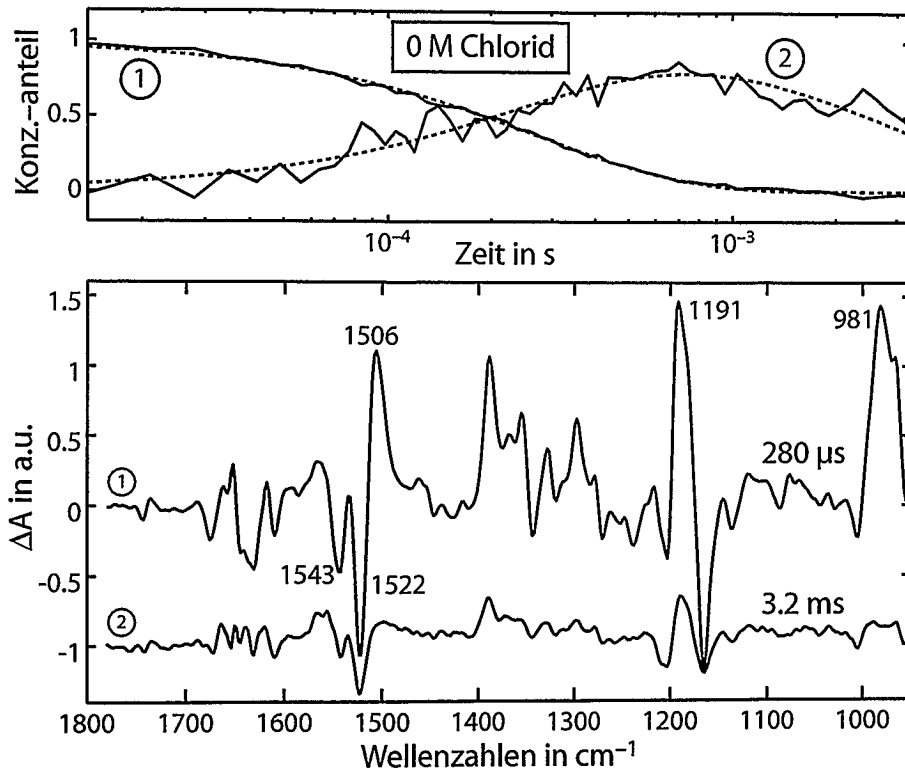


Abbildung 5.16 Kinetische Analyse der zeitaufgelösten IR-Messungen an HR bei einer Chloridkonzentration von 0 mol/l. Eine Summe von Exponentialfunktionen wurde an die Zeitverläufe angepasst und anschließend bei Benutzung eines sequentiellen Modells des Photozyklus dieser Satz an Intermediaten berechnet. Die angegebenen Zeiten entsprechen den gefitteten Zeitkonstanten und somit in diesem Modell den Zerfallskonstanten der entsprechenden Intermediate.

Modell die Konzentrationsverläufe der Intermediate und die zugehörigen Spektren berechnet. Abb. 5.16 zeigt diese Analyse bei einer Chloridkonzentration von 0 mol/l. Wie schon die frühen Spektren in Abb. 5.14 gezeigt haben, findet man bei keinen oder wenigen Chloridionen in der Lösung beim Beginn der Zeitauflösung ein K-Spektrum, welches sich in diesem Fall sehr deutlich durch die HOOP-Moden, einen sehr starken Peak im *fingerprint*-Bereich bei 1191 cm^{-1} und die positive rotverschobene C=C-Bindungs-Bande bei 1506 cm^{-1} auszeichnet. Allerdings deutet die zusätzliche negative Bande bei 1543 cm^{-1} auf eine zweite C=C-Doppelbindungsschwingung eines Grundzustandes hin, die mit dem Laserblitz angeregt wurde. Die Blauverschiebung lässt die Deutung zu, dass es sich hierbei um die Photoreaktion eines 13-*cis*-Retinals und damit um den Einfluss der nicht hundertprozentigen Lichtadaptation von HR handelt.

Das zweite sequentielle Intermediat erscheint auf den ersten Blick wie ein K-

5 Ergebnisse und Diskussion

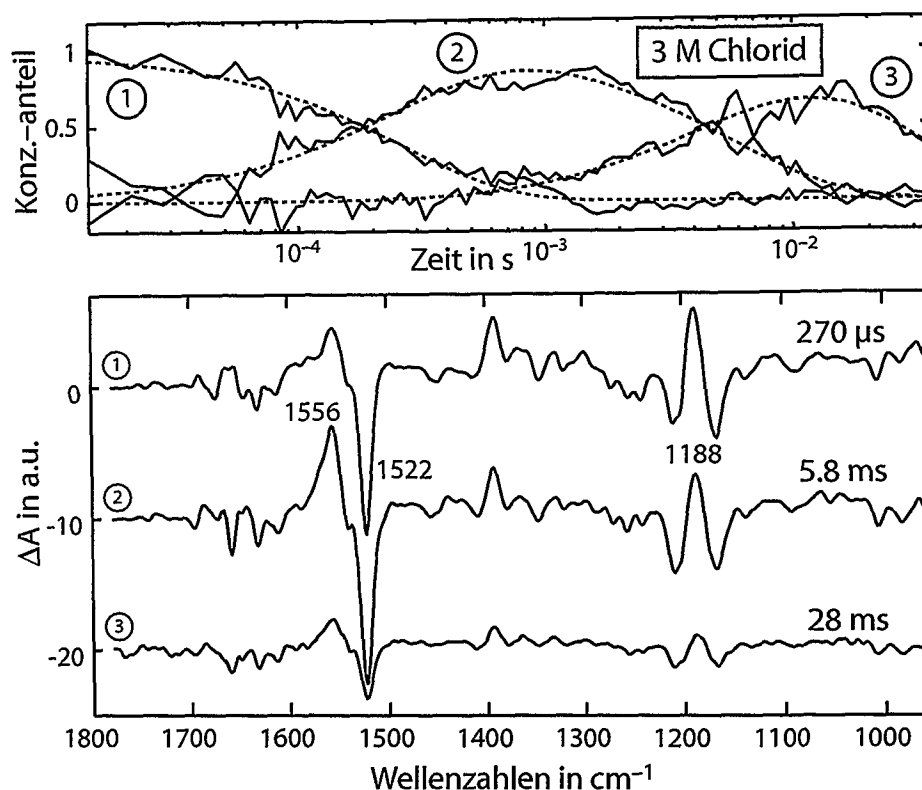


Abbildung 5.17 Entsprechend der vorigen Abb. 5.16 die Ergebnisse einer analogen Analyse der Messdaten bei einer Konzentration von 3 mol/l Chlorid. In diesem Fall sind 3 Komponenten zur Anpassung einer Summe von Exponentialfunktionen notwendig.

Intermediat mit deutlich geringerer Amplitude. Allerdings zeigt eine Skalierung auf vergleichbare Werte bei z.B. 1523 cm^{-1} (hier nicht dargestellt), dass doch deutliche Unterschiede zwischen den Spektren bestehen: Vor allem die HOOP-Moden und die C=C-Doppelbindung bei 1506 cm^{-1} sind deutlich schwächer ausgeprägt. Die insgesamt stark verringerten Amplituden des Spektrums deuten darauf hin, dass dieses Intermediat nicht von allen Proteinen durchlaufen wird und somit eine Aufzweigung des Zyklus nach K entweder direkt zurück in den Grundzustand oder über dieses leicht abgeänderte K' in den Grundzustand möglich ist. Genauso kann es sich aber auch um den Einfluss des 13-*cis*-Photozyklus handeln, der in unserem Modell nicht aufgetrennt werden kann.

Abb. 5.17 zeigt analog die Datenauswertung bei einer Chloridkonzentration von 3 mol/l. Im Gegensatz zur vorherigen Analyse sind hier drei Intermediate zur Beschreibung der Daten notwendig. Wie schon Abb. 5.13 zeigt, ist bei dieser Chloridkonzentration ein K-Spektrum nicht mehr zu detektieren. Die ersten

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

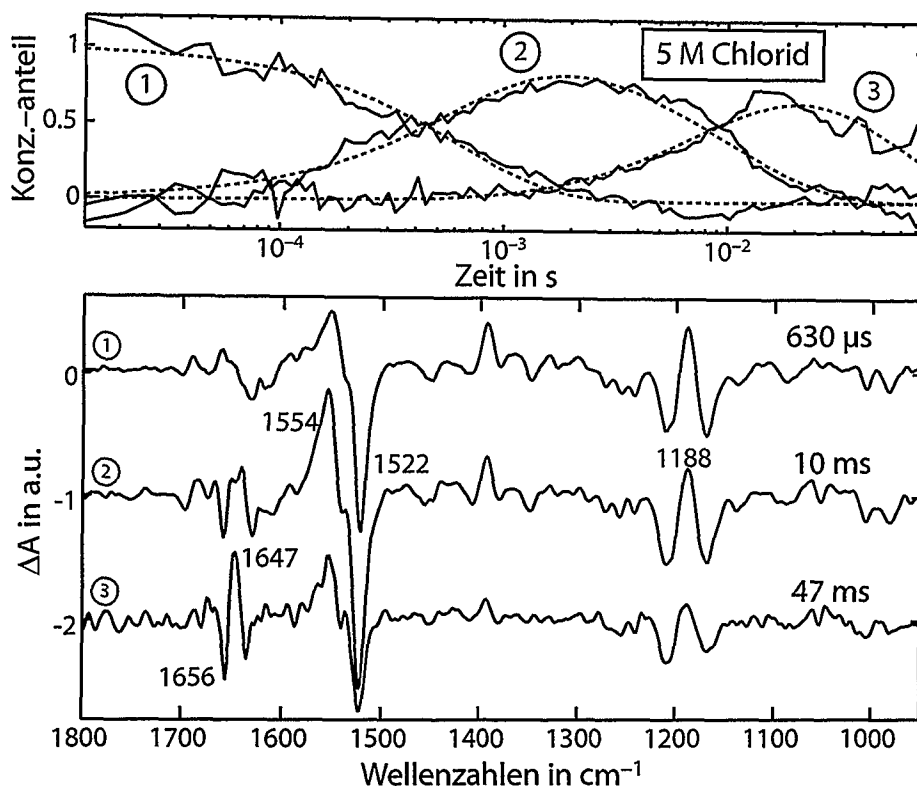


Abbildung 5.18 Entsprechend den beiden vorherigen Abbildungen eine Analyse der Kinetik bei einer Chloridkonzentration von 5 mol/l. Die Zeiten geben die Zerfallskonstanten der mit Hilfe eines sequentiellen Modells berechneten Intermediate wieder.

beiden Komponenten zeigen nur geringe Unterschiede, die sich einerseits durch leichte Variationen in der Höhe und Form der Retinalbanden, und andererseits in deutlichen Veränderungen im Bereich der Amid I Bande zeigen. Dagegen scheint die dritte Komponente, ähnlich wie die zweite in der vorherigen Messung, sehr kleine Amplituden darzustellen und somit kein echtes sequentielles Intermediat zu repräsentieren. Vielmehr zeigt es nach Skalierung sehr starke Ähnlichkeiten mit der zweiten Komponente. Zwei sehr ähnliche Spektren, die direkt hintereinander entstehen sollen, deuten darauf hin, dass es sich um ein und dasselbe Intermediat handelt, dessen Zerfall nicht exponentiell erfolgt. Entweder ist dies wirklich nicht der Fall (keine Reaktion erster Ordnung) oder der Zeitverlauf ist durch Rauschen oder Drift verfälscht. Letzteres ist aufgrund der extrem kleinen Signale in diesem Fall recht wahrscheinlich.

Die Analyse der zeitaufgelösten Messung bei einer Chloridkonzentration von 5 mol/l findet sich in Abb. 5.18. Das erste Spektrum zeigt im Vergleich mit dem

5 Ergebnisse und Diskussion

ersten Spektrum bei 3 M Chlorid gleiche Strukturen der Retinalbanden; lediglich im Bereich der Amid I Bande finden sich signifikante Unterschiede. Die beiden zweiten Spektren dagegen sind im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses identisch, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es sich hierbei um ein reines Intermediat handelt, während die leichten Variationen in den ersten Spektren bei 3 und 5 mol/l dafür sprechen, dass es sich um ein Mischspektrum mit verschiedenen Anteilen handelt. Die Trennung funktioniert in diesem Fall nicht, weil entweder das angenommene Modell nicht stimmt (es also Hin- und Rückreaktionen oder Verzweigungen gibt) oder die Intermediate zeitlich zu nah beieinander liegen. Im Folgenden werden die zweiten Spektren aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zu entsprechenden BR-Absorptionsänderungen im Photozyklus als L_1 -Spektren bezeichnet; die Mischspektren zeigen ebenfalls deutliche Anzeichen eines L-Intermediates, sowie angedeutete Spuren von K, so dass die Bezeichnung K/L_1 gewählt wird.

Das dritte Spektrum der Messung bei 5 mol/l zeigt vor allem im Amid I Bereich starke Unterschiede zur zweiten Komponente, während die Änderungen in den Retinalbereichen gering sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Intermediat strukturelle Änderungen des Proteinrückgrates darstellt, ist vor allem im Vergleich mit den entsprechenden BR-Banden im N-Intermediat hoch. Im Vergleich mit den vorherigen Kinetiken kann aufgrund der deutlichen Differenzbanden zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} eine Akkumulation dieses Intermediates bei einer Chloridkonzentration von 3 M oder weniger ausgeschlossen werden. Damit wird dieser Zustand entweder nur bei extremen Chloridkonzentrationen durchlaufen, oder der Zerfall ist bei niedrigen Werten so schnell, dass das Intermediat nicht detektiert werden kann. Da die Retinalbanden wiederum deutliche Anzeichen eines L-Intermediates zeigen und nur der Amid I Bereich variiert, wird dieses Intermediat als L_2 bezeichnet.

Zur Bestätigung der strukturellen Veränderungen im Protein als Ursache dieser Banden im Amid I Bereich des späten Intermediates L_2 wurden *polarisierte* zeitaufgelöste Messungen bei 5 M Chloridkonzentration durchgeführt. Abb. 5.19 zeigt zwei Spektren, die aus diesen Messungen extrahiert wurden. Dabei handelt es sich um Spektren, die über Zeitbereiche gemittelt wurden, in denen der jeweilige Zustand nach den Zeitverläufen in Abb. 5.18 ohne große Überlappungen anderer Intermediate maximal ist. Um die Anzahl der benötigten Spektren klein zu halten¹⁹ wird in diesem Fall auf eine kinetische Analyse, die ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis benötigt, verzichtet. Dennoch reichen diese gemittelten Messungen aus, um die obige Vermutung zu bestätigen: Die in L_2 hinzu kommenden Banden im Amid I

¹⁹ Die Differenzsignale von HR im Photozyklus sind im Vergleich zu BR von vornherein um ca. einen Faktor 10 kleiner. Um die Anzahl der Messungen klein zu halten, wurden bei den Titrationsmessungen AC-gekoppelte Signale aufgenommen, was sich in diesem Fall aufgrund der Bildung von L_2 zu späten Zeiten verbietet. Bei dem hier zusätzlich eingebrachten Polarisationsfilter und dem weiter verringerten Signal/Rausch-Verhältnis stößt die Apparatur an seine Grenzen.

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

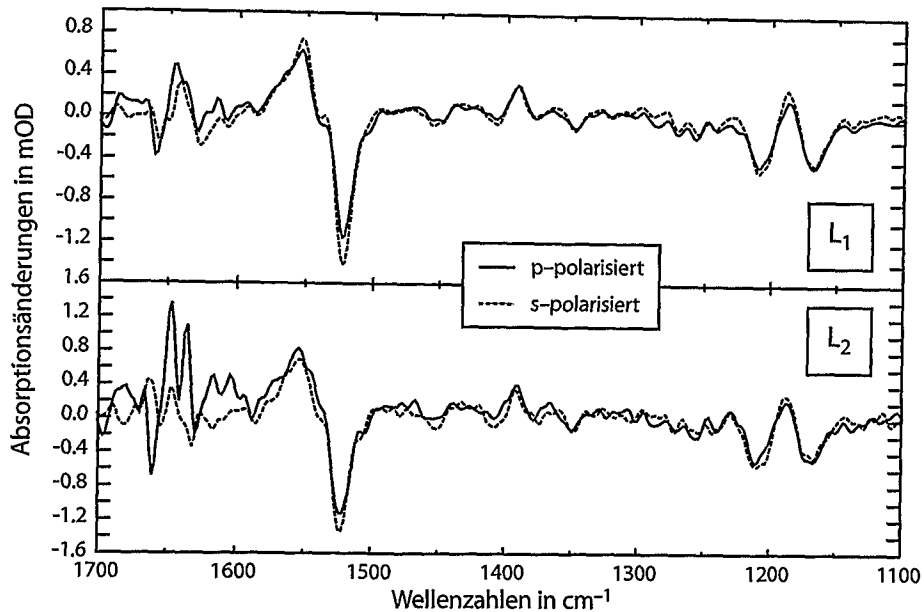


Abbildung 5.19 Differenzspektren aus Zeitbereichen, in denen die Intermediate L_1 und L_2 nach Abb. 5.18 maximal sein sollten, diesmal p - und s -polarisiertem Licht gemessen. Wie schon im Fall von BR (siehe Abschnitt 5.1) lassen sich mit dieser Methode Veränderungen im Amid I Bereich auf Konformationsänderungen des Proteinrückgrats zurückführen.

Bereich zeigen einen so deutlichen Dichroismus, dass es sich mit großer Sicherheit um Amid I Banden von α -Helices handelt, die parallel zur Membrannormalen angeordnet sind und sich in diesem Intermediat verändert haben.

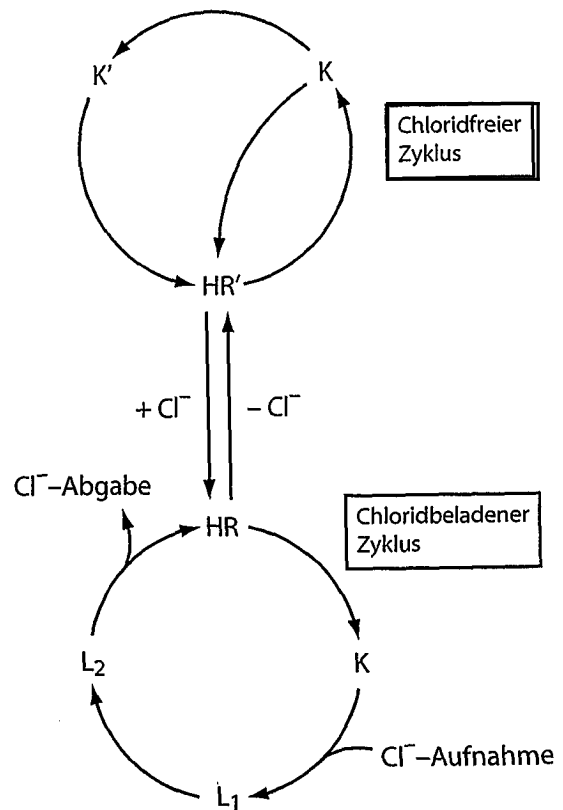
5.2.5 Analyse der Photozykluskinetik

Die Ergebnisse der obigen Messung werden im folgenden noch einmal zusammengefasst, um dann Schlussfolgerungen für die Kinetik des Photozyklus treffen zu können:

- Ohne Chloridionen bzw. — im Fall einer starken Bindung der Ionen an das Protein — mit einer minimalen Menge an Chlorid ergibt sich ein vergleichsweise kurzer Photozyklus (letzte Zeitkonstante 3.2 ms) dessen zwei Komponenten nach Abb. 5.16 deutliche Anzeichen eines K-Intermediates zeigen.
- Bei Erhöhung der Chloridkonzentration zeigt sich nach Abb. 5.14, dass der Rückgang dieses K-Intermediates stetig erfolgt und komplementär das nachfolgende Intermediat zu diesem Zeitpunkt auftaucht.
- Dieser stetige Übergang ist in den DC-gekoppelten Messungen nicht mehr

5 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 5.20 Ein Modell des Photozyklus von Halorhodopsin wie es aus den zeitaufgelösten Infrarotdaten geschlossen werden kann. Dieses Modell stellt in Kombination mit sinnvollen Annahmen einen Zyklus dar, der die gemessenen Daten erklären kann, aber in keiner Weise einen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt. Die starke Abhängigkeit von der Chloridkonzentration ist einerseits durch das Gleichgewicht von HR und HR' und andererseits durch kinetische Unterschiede im chloridbeladenen Photozyklus gegeben.



nachvollziehbar, da bei einem Sprung der Chloridkonzentration von 0 mol/l nach 3 mol/l von einem reinen K Spektrum nichts mehr zu sehen ist.

- In der SVD-Analyse der frühen Spektren in Abb. 5.14 ist ebenfalls ablesbar, dass die ersten Spektren in den Abbildungen 5.17 und 5.18 immer noch geringe Anteile von K enthalten. Zusammen mit der offensichtlichen Ähnlichkeit mit einem L-Spektrum und zur Abgrenzung gegenüber dem bei 5 mol/l nachfolgenden Intermediat werden diese Spektren als L₁-Spektren bezeichnet.
- Beim Schritt von 3 mol/l zu 5 mol/l gibt es eine erneute Verlängerung des Photozyklus und ein neues Intermediat mit deutlichen Unterschieden im Amid I Bereich gegenüber L₁ entsteht. Aufgrund der Ähnlichkeit mit einem L-Spektrum in den Retinalbereichen wird es als L₂ bezeichnet.

Ein Schema der Photoreaktionen von HR, das diese Beobachtungen mit Hilfe einiger plausibler Annahmen erklären kann, findet sich in Abb. 5.20. Die sehr starken Unterschiede beim Übergang von 0 mol/l Chloridionen zu 3 mol/l angefangen bei einerseits zwei, andererseits drei benötigten Exponentialfunktionen zum Fit der Kinetiken, dem Unterschied von einer Größenordnung in der Länge des Photozyklus und den deutlich unterschiedlichen, berechneten Intermediaten lassen die

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

Annahme eines eigenen Photozyklus für chloridfreies Protein plausibel erscheinen. Dieser Zyklus ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt und beschränkt sich auf das Durchlaufen eines K-Intermediates, das entweder über K' zerfällt oder direkt in den Grundzustand zurückkehrt, da es sich bei K' um den Einfluss eines 13-*cis*-Photozyklus handelt. Offenbar können die unter physiologischen Bedingungen durchlaufenen weiteren Intermediate ohne vorhandenes Chlorid nicht entstehen.

Bei Chloridzugabe geht das Protein bis in den Bereich von 3 mol/l Chloridionen in den physiologischen, chloridpumpenden Zustand über. Der zugehörige Photozyklus, wie er sich in den zeitaufgelösten Messungen darstellt, ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen. Laut Abb. 5.14 nimmt der Anteil von K bei steigender Chloridkonzentration kontinuierlich ab. Damit stellt sich die Frage, ob diese Abnahme durch den Übergang vom chloridfreien Photozyklus zum chloridbeladenen entsteht und damit ein K wie im oberen Zyklus gar nicht mehr durchlaufen wird, oder aber der Zerfall von K bei steigendem Chloridgehalt beschleunigt wird, und damit mit unserer Zeitauflösung nicht mehr detektiert wird. Mit Blick auf den BR Photozyklus, bei dem unter physiologischen Bedingungen das K-Intermediat ebenfalls nicht in unseren Zeitbereich fällt, und zusätzlich die Wahrscheinlichkeit für unterschiedliche Reaktionswege zwischen HR und BR mit der umgekehrten Reihenfolge abnimmt²⁰, wird im Folgenden von der zweiten Möglichkeit des beschleunigten Zerfalls von K ausgegangen.

Der nächste detektierbare Zustand ist ein K/L₁ genanntes Intermediat, was für eine wie auch immer geartete Mischung aus K und L₁ steht. Diese Mischung kann in der kinetischen Analyse, die auf einem sequentiellen Modell beruht, entweder aufgrund von Hin- und Rückreaktionen, oder aber aufgrund von Abweichungen der Übergänge erster Ordnung zustande kommen. Es wird sich also aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um ein eigenständiges Intermediat handeln und wird im vorgeschlagenen Photozyklus nicht berücksichtigt.

Der bei steigender Chloridkonzentration festgestellte schnellere Zerfall von K hat einen dementsprechend schnelleren L₁-Aufbau zur Folge, so dass geschlossen werden kann, dass dies derjenige Schritt ist, bei dem die Aufnahme eines Chloridions aus der Umgebung stattfindet. Damit ist dieser Schritt sehr stark von der Konzentration abhängig und kann wie im Fall von 0 mol/l den weiteren physiologischen Ablauf komplett stoppen. Bei gesteigerter Chloridkonzentration ist die Besetzungswahrscheinlichkeit für eine Chloridbindestelle erhöht und damit die Voraussetzung für den Aufbau der nachfolgenden Intermediate im Durchschnitt schneller gegeben.

²⁰ Die sehr frühen Intermediate betreffen im Wesentlichen die Struktur des Retinals, also Isomerisierung und Verdrillung, so dass die Umgebung zu diesen Zeitpunkten eine kleinere Rolle spielen sollte. Erst wenn es um die eigentliche biologische Funktion geht, sollten signifikante Unterschiede auftreten, was sich beispielsweise im Fehlen des M-Intermediates bei HR widerspiegelt.

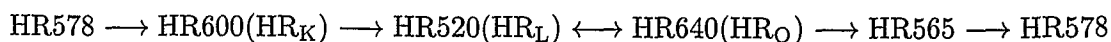
5 Ergebnisse und Diskussion

Das nachfolgende aufgrund ähnlicher Retinalbanden L_2 genannte Intermediat lässt sich nur bei einer Chloridkonzentration von 5 mol/l detektieren, was wiederum die Frage aufwirft, ob dieser Zustand bei 3 mol/l gar nicht oder zu schnell für unsere Zeitauflösung durchlaufen wird. Komplementär der Chloridaufnahme bietet sich allerdings wiederum eine einfache Erklärung an und wurde in das Modell in Abb. 5.20 aufgenommen: Wenn beim Übergang von L_2 in den Grundzustand die Chloridabgabe in die Lösung passiert, dann ließe sich dieser Schritt bei einer extrem hohen Konzentration wie 5 mol/l verlangsamen und das entsprechende L_2 -Spektrum so akkumulieren, dass es für unsere Methode nachweisbar wird.

5.2.6 Das Modell im Vergleich

Das im vorherigen Abschnitt vorgestellte Modell der Halorhodopsin Photoreaktionen basiert ausschließlich auf den dargestellten zeitaufgelösten Infrarotmessungen. Damit stellt sich die Frage, wie sich dieses Modell in die bestehende Auffassung zum Verlauf des HR Photozyklus einpasst. Da diese Modelle im Wesentlichen auf UV/VIS-Daten beruhen, bzw. auf FTIR-Messungen ohne reproduzierbare Chloridkonzentrationen, basiert die Zuordnung der hier festgestellten Intermediate und deren Spektren im Infraroten zu den Intermediaten im Sichtbaren einerseits auf entsprechenden Parallelmessungen mit BR, andererseits auf in unserem Labor durchgeführten Messungen im UV/VIS, die an anderer Stelle dargestellt werden [85, 86].

Das allgemein akzeptierte Modell [40, 41] geht von einem Photozyklus



aus, der sich einerseits auf experimentelle Daten stützt, andererseits aber auch auf mechanistischen Überlegungen basiert. Beispielsweise ist das Intermediat HR565 als Mitglied des chloridtransportierenden Photozyklus eingeführt, um nicht *zwei* Schritte, nämlich Rückisomerisierung und Chloridaufnahme beim Übergang von HR640 nach HR578 zulassen zu müssen [87, 43, 88, 45]. Eine spektroskopische Beobachtung dieses Intermediates als Teil des chloridpumpenden Photozyklus gibt es bisher nicht. Im Vergleich dieses Modells mit den spektroskopischen Daten in der Literatur fällt desweiteren auf, dass einerseits beim Übergang von HR600 nach HR520 ein Zwischenzustand HR_{KL} gesehen wird [88] und andererseits zwei verschiedene L -Zustände detektiert werden [47], so dass der spektroskopisch beobachtete Photozyklus in der Literatur folgendermaßen angenommen wird:

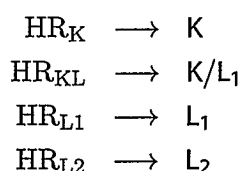


Die funktionalen Schritte sind in diesem Modell die Bindung des Chloridions in der Nähe der Schiffischen Base im Übergang nach HR_{L1} , der nachfolgende *Switch* beim Übergang zu HR_{L2} , der chloridkonzentrationsabhängige Schritt nach HR_O mit der

5.2 Spektroskopische Untersuchungen an HR

Chloridabgabe und die Reisoomerisierung und Chloridaufnahme beim Schritt in den Grundzustand. Insgesamt wird davon ausgegangen, dass auf der extrazellulären Seite zwei Chloridbindestellen vorhanden sind; eine in der Nähe der Schiffchen Base, die auch in der Kristallstruktur gesehen wird [42] und eine nicht identifizierte Stelle vom Retinal weiter entfernt, die in obigem Modell zu Beginn des Photozyklus als besetzt angenommen wird. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass zuerst eine Ionenabgabe im Übergang nach HR_O und anschließend im Übergang in den Grundzustand die Chloridaufnahme passiert.

Vergleicht man dieses Modell mit dem in dieser Arbeit vorgestellten, so bietet sich eine direkte Zuordnung an:



Da mit den Infrarotmessungen allein zwei Chloridbindestellen im extrazellulären Bereich nicht festgestellt werden können, nehmen wir als chloridaufnehmenden Schritt die Bindung in unmittelbarer Nähe der Schiffchen Base an, der in unserem Fall im Gegensatz zu den berichteten Analysen zusätzlich von der Chloridkonzentration abhängt. Im Literaturmodell ist dieser Schritt von außen nicht beeinflussbar, so dass eine frühere Bindungsstelle das Ion nach außen hin abschotten muss. Unser Modell favorisiert also eher einen offenen Kanal bis zur Bindung an der Schiffchen Base. Wenn das Ion diesen Platz einnimmt, ist in beiden Modellen nichtsdestotrotz der gleiche Zustand erreicht.

Im Übergang von HR_L1 nach HR_L2 sieht das Literaturmodell eine Analogie zu BR: Der *Switch*, der die Zugänglichkeit der Kanäle ändert, soll wie bei BR im M_1 nach M_2 Übergang zwischen diesen beiden L-Intermediaten passieren. Da bei BR nach dem Switch offenbar Strukturänderungen folgen, stimmt deren Feststellung in unserem L_2 sehr gut mit dem Literaturmodell überein. Zusätzlich fordert auch die Kristallstruktur, einerseits aufgrund fehlender Chloridbindestellen im cytoplasmatischen Bereich und andererseits wegen eines blockierten potentiellen Weges, Strukturänderungen vor der Chloridabgabe. In [42] wird ein transientes Öffnen dieses Weges unter Umständen durch ein Kippen des C-terminalen Endes von Helix E postuliert.

Die Nichtbeobachtung von HR_O in unseren Messungen deckt sich mit entsprechenden Feststellungen bei höheren Chloridkonzentrationen [44, 89]. Zusätzlich zeigt ein Vergleich der Intermediatspektren neuerer FTIR-Studien [89] gute Übereinstimmungen mit den hier vorgestellten Spektren, wenn man davon ausgeht, dass eine reproduzierbare Einstellung der Chloridkonzentration in Transmissionsmessungen nicht möglich ist: Die beiden gefundenen Intermediate mit Zeitkonstanten von 146 μs und 15 ms zeigen deutliche Ähnlichkeiten zum K/L_1 - und L_1 -Spektrum

5 Ergebnisse und Diskussion

bei 3 mol/l Chloridkonzentration in Abb. 5.17. Das Fehlen eines L₂-Intermediates in dieser Studie ist offensichtlich auf zu geringe Chloridkonzentrationen zurückzuführen, die als größer 2 mol/l angegeben werden.

Insgesamt passt der hier vorgestellte Zyklus also gut zu den bereits vorgeschlagenen Modellen und gibt Hinweise auf den Zusammenhang zwischen den Kinetiken bei *extremen* (sowohl in die eine als auch in die andere Richtung) Chloridkonzentrationen und liefert neue Analogien zu BR bei der Feststellung von Strukturänderungen des Proteinrückgrates im L₂-Intermediat. Die unterschiedlichen Schlussfolgerungen in Bezug auf Reihenfolge und Intermediatschritte der Chloridaufnahme und -abgabe hängen direkt mit der entweder vorhandenen oder fehlenden Chloridabhängigkeit dieser Schritte zusammen. Die Abhängigkeit des K-Zerfalls in unseren Messungen ist eine einfache Erklärung der Messergebnisse, die allerdings gerade am Anfang des Photozyklus aufgrund des nicht geklärten Einflusses des chloridfreien Zyklus bzw. des 13-*cis*-Zyklus verfälscht sein kann.

Ganz offensichtlich zeigt die vorliegende Studie allerdings, dass beim starken Einfluss der Chloridkonzentration auf den HR Photozyklus die Annahme von Chloridbindstellen mit Affinitäten im Bereich um 5 mol/l nicht unwahrscheinlich ist, was in elektrischen Messungen bestätigt wird [90]. Desweiteren zeigen in unserem Labor durchgeführte Messungen im UV/VIS entsprechende Resultate, die an anderer Stelle dargestellt werden [85, 86].

5.3 Resonanz-Raman-Spektroskopie

5.3.1 Durchflussmessungen an Bacteriorhodopsin

Zum Test der in Abschnitt 4.2 ausführlich vorgestellten Raman-Apparatur diene aufgrund der bekannten Schwingungsspektren in der Ramanstreuung das aus den vorigen Kapiteln bekannte Bacteriorhodopsin. Ausführliche Studien zu den Ramanspektren von BR, die bei den folgenden Messungen als Referenz dienten, finden sich in [78, 80, 79].

Die Resonanz-Raman (RR)-Messungen dienen in unserem Fall in erster Linie der Bandenzuordnung für die zeitaufgelösten Messungen im Infraroten. Aufgrund des Resonanz-Effektes²¹ detektiert man bei BR nur Schwingungsabsorptionen des Retinals und seiner unmittelbaren Umgebung, was bereits einen Großteil der Banden im Schwingungsabsorptionsspektrum zuordnet. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, über die Variation der Anregungswellenlänge die *Stärke* des Resonanz-Effektes zu verändern und verschiedene Komponenten eines Gemisches mit unterschiedlichen Absorptionsspektren im Sichtbaren zu trennen. Für BR kann man

²¹ Man strahlt in die Absorption eines elektronischen Übergangs ein und detektiert im Wesentlichen Schwingungsbanden, die von demjenigen Molekülteil stammen, das dem elektronischen Übergang zugrunde liegt. Damit ist die Voraussetzung für Resonanzmessungen mit einer Anregung im Sichtbaren das Vorhandensein eines Chromophors.

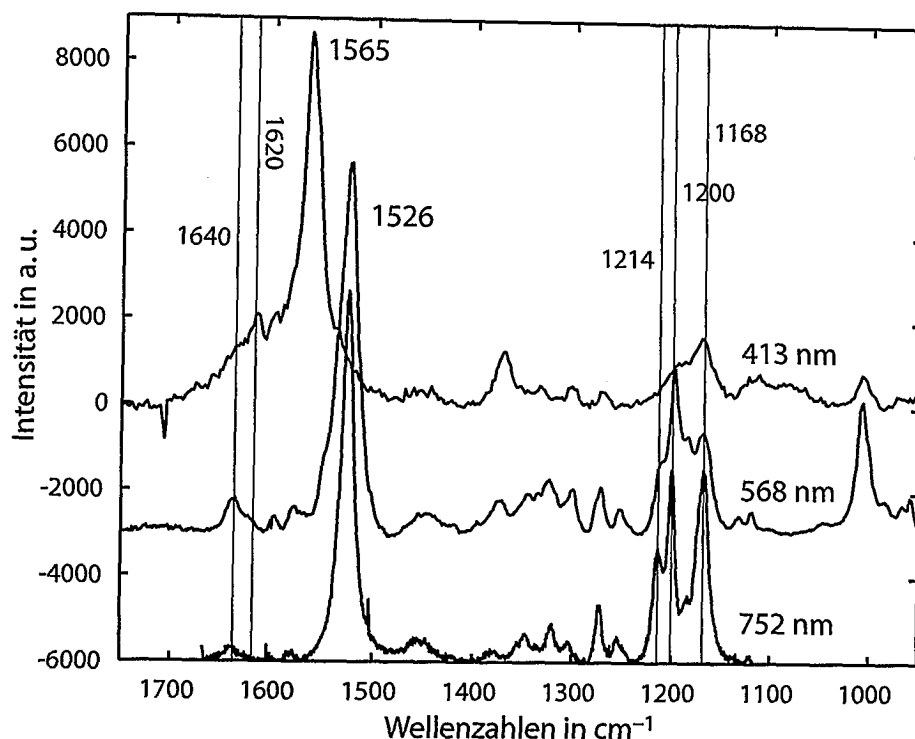


Abbildung 5.21 Resonanz-Raman-Spektren von Bacteriorhodopsin, die bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen in der Durchflusszelle aufgenommen wurden. Sowohl bei 752 nm als auch bei 568 nm wird nur der Grundzustand detektiert; die Messung bei 413 nm zeigt dagegen ein deutliches M-Intermediat.

auf diese Weise die RR-Spektren der Intermediate voneinander trennen: Abb. 5.21 zeigt Messungen an BR mit der in Abschnitt 4.2.4 dargestellten Durchflusszelle bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen. Die Kurve der Messung bei 752 nm wurde gleichzeitig mit hoher Umdrehungszahl der peristaltischen Pumpe durchgeführt, so dass ein reines Spektrum des Grundzustandes gemessen werden kann: Erstens ist die Anregungswellenlänge recht weit vom Maximum der BR-Absorption von 570 nm entfernt, zweitens wird auf der rotverschobenen Seite des BR-Spektrums angeregt, so dass nominell die Energie eines Photons zu *niedrig* und nicht zu hoch ist (in diesem Fall könnte der Überschuss einfach dissipieren) und drittens ist die Flussgeschwindigkeit der Probe so hoch, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül von *zwei* Photonen während der Fokuspassage getroffen wird (eines zur Photoaktivierung und eines zur Ramanmessung des entstandenen Intermediates), sehr gering ist.

Das Ramanspektrum einer Anregung bei 568 nm dagegen strahlt direkt in das Maximum der BR-Absorption ein und man erhält ein deutlich stärkeres Raman-

5 Ergebnisse und Diskussion

signal²², welches allerdings auch von einem deutlich stärkeren Fluoreszenzuntergrund begleitet wird²³. Der mit dem hochauflösenden Gitter (1800 Striche/mm) gemessene spektrale Bereich ist aufgrund des nichtlinearen Gitterverhaltens deutlich größer, die Auflösung damit einhergehend allerdings kleiner, was sich in der Verbreiterung der Absorptionen widerspiegelt. Allerdings zeigt die Lage der C=C-Doppelbindungsabsorption von 1526 cm^{-1} , dass auch in diesem Fall ein eventuell angeregtes Intermediat nicht detektiert werden kann.

Die dritte Kurve dagegen zeigt das Ramanspektrum bei einer Anregung von 413 nm und wurde zusätzlich bei reduzierter Flussgeschwindigkeit der Probe aufgenommen. Der nach 1565 cm^{-1} verschobene Peak der C=C-Bindung zeigt ein deutliches M-Intermediat an, was sich erstens aufgrund der geringen Geschwindigkeit der Probe und entsprechend hoher Photokonversion, zweitens mit einer im Vergleich zu allen anderen Intermediaten langen Lebensdauer von M und drittens aufgrund des Absorptionsmaximums von M bei 412 nm und damit maximaler Resonanz erklären lässt. Im Vergleich dieser Spektren mit Literaturspektren aus [78, 80] ergeben sich im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses und unter Beachtung unterschiedlicher Anregungswellenlängen gute Übereinstimmungen.

Zum Vergleich mit den Daten aus den zeitaufgelösten Infrarotmessungen ist in Abb. 5.22 ein Differenzspektrum aus der 752 nm-Messung des Grundzustandes und der letzteren 413 nm-Messung des M-Intermediates berechnet worden. Im unteren Teil der Abbildungen finden sich die M-Intermediatspektren der polarisierten Messungen aus Abschnitt 5.1.4 (vgl. Abb. 5.9, Seite 69). Man erkennt die gute Übereinstimmung der Frequenzen der großen Retinalbanden des Grundzustandes sowohl im fingerprint-Bereich als auch bei der C=C-Doppelbindung, wenn auch die relative Höhe der Absorptionen deutlich variiert: Beispielsweise zeigt die linke Bande des Dreizacks bei 1251 cm^{-1} eine nur geringe Ramanaktivität. Die Tatsache, dass es sich bei den Absorptionen in der oberen Kurve allein um Retinalbanden handelt, hilft allerdings, die in Abschnitt 5.1.5 diskutierte Bandenform bei 1550 cm^{-1} zu verstehen: Offenbar setzt sich diese einerseits aus der Retinalbande bei 1565 cm^{-1} zusammen, andererseits müssen zusätzliche Beiträge vorhanden sein, um die breite Struktur im Infrarotspektrum zu erklären. Aufgrund der großen Änderungen im Amid I Bereich ist es recht wahrscheinlich, dass entsprechend Änderungen im Amid II Bereich dafür verantwortlich sind. Die Ursache der Bandenschulter mit dem auffälligen Dichroismus kann ohne zusätzliche Informationen allerdings nicht geklärt werden, da die mit *p*-polarisiertem Licht besser detektierbare Bande weder für eine Amid II noch für eine Retinalbande spricht.

²² Dies äußert sich in dieser Abbildung nicht durch die Bandenhöhe, da die Kurven aufeinander skaliert wurden, ist aber am Signal/Rausch-Verhältnis während der Messung deutlich zu erkennen.

²³ Um die drei Messungen zu vergleichen, wurde die Basislinie bei allen drei Kurven korrigiert; der Fluoreszenzuntergrund lässt sich aufgrund seiner Breite gut abziehen, ist aber eher ein Problem beim Signal/Rausch-Verhältnis.

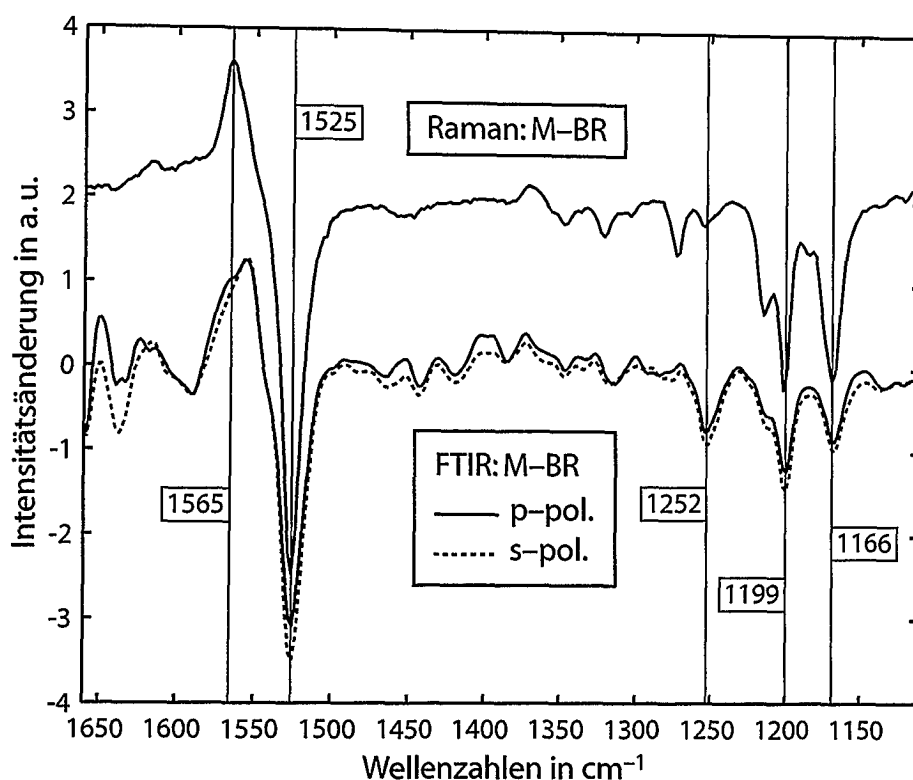


Abbildung 5.22 Berechnete Differenzspektren von Bacteriorhodopsin einerseits aus den polarisierten zeitaufgelösten Messungen in Abschnitt 5.1.4, andererseits aus den Ramanmessungen in Abb. 5.21. Da das Resonanz-Raman-Spektrum nur Retinalbanden zeigt, lässt sich hiermit eine einfache Bandenzuordnung erreichen.

Die großen Änderungen im Amid I Bereich, die in den Infrarotmessungen deutlich zu sehen sind, werden im Resonanz-Raman-Spektrum genauso wie die Asp 85-Banden nicht detektiert (nicht gezeigt), so dass der dargestellte Messbereich ausreichend ist. Dagegen sind im Ramanspektrum die Absorptionen der Schiffischen Base bei 1641 cm^{-1} (Grundzustand) und 1621 cm^{-1} (M) deutlich zu erkennen, die entsprechenden Änderungen gehen in den Infrarotmessungen aber durch die großen Banden im Amid I Bereich verloren.

5.3.2 Messungen an Halorhodopsin

Durchflussmessungen

Da die Informationen über die Schwingungsspektren von Halorhodopsin im Vergleich zu Bacteriorhodopsin spärlich sind, bietet sich die Übertragung der oben auf BR angewandten Methode zur Bandenzuordnung auf HR an. Dementspre-

5 Ergebnisse und Diskussion

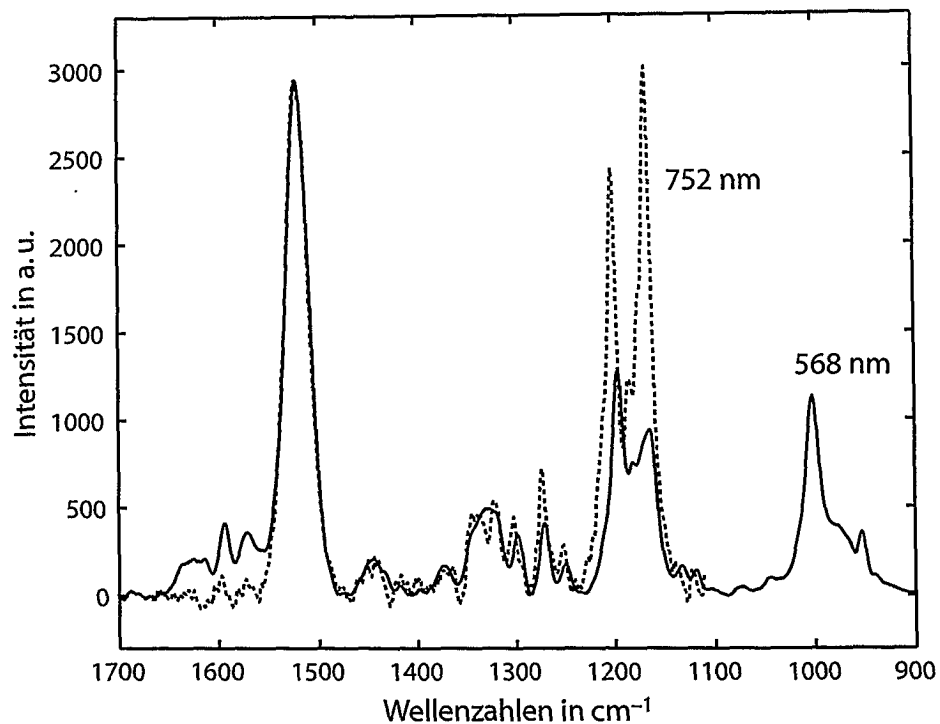


Abbildung 5.23 Resonanz-Raman-Messungen an Halorhodopsin bei Anregungswellenlängen von 568 nm und 752 nm im Durchfluss. Da die Spektren bei einer Chloridkonzentration von 0 mol/l aufgenommen wurden, lässt sich keine eindeutige Bande der Schiffischen Base feststellen.

chend wurden Resonanz-Raman-Spektren von HR im Durchfluss zuerst bei einer Chloridionenkonzentration von 0 mol/l durchgeführt. Abb. 5.23 zeigt zwei Spektren bei den Anregungswellenlängen von 568 nm und 752 nm. Die wichtige Frage nach der Frequenz der Schiffischen Base-Schwingung im Bereich knapp oberhalb von 1600 cm^{-1} bei einer *besetzten* Chloridbindestelle in der Nähe des Retinals [42] lässt sich damit allerdings nicht bestimmen. Leider scheiterten alle Durchflussmessungen schon bei einer Chloridkonzentration von 1 mol/l, da die Purpurmembranfragmente aggregieren und somit einen Fluss durch die Kapillare unmöglich machen. Um trotzdem ein Ramanspektrum messen zu können, wurde an einem Purpurmembranfilm gemessen.

Messungen an Proteinfilmen

Die Präparation zur Messung an einem Proteinfilm verläuft analog zur Herstellung der Proteinfilme auf den ATR-Kristallen (Abschnitt 4.1.3): Die Lösung der Membranfragmente wird auf einem Objektträger eingetrocknet und muss anschlie-

5.3 Resonanz-Raman-Spektroskopie

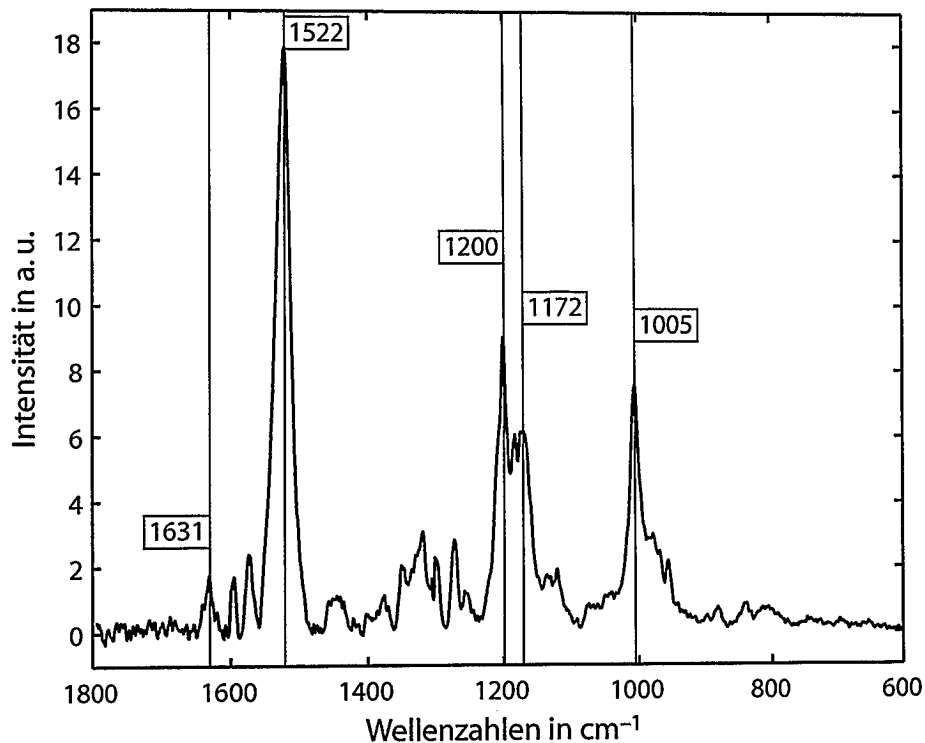


Abbildung 5.24 Resonanz-Raman-Messungen an Halorhodopsin bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm. Um eine hohe Chloridkonzentration einstellen zu können, wurde ein Purpurmembranfilm durch Eintrocknen hergestellt und anschließend mit einer 3 M KCl-Lösung (pH 6, 10 mM Phosphatpuffer) rehydriert. Mit dem Immersionsobjektiv wurde der Tropfen angefahren und der Laser auf den Film fokussiert.

ßend mit einer hochmolaren Salzlösung rehydriert werden, damit der Film sich nicht ablöst. Das mit dem Immersionsobjektiv gemessene Ramanspektrum bei 3 M Chlorid ist in Abb. 5.24 dargestellt. Wegen der starken Ähnlichkeit zum Retinal in BR läßt sich das Grundzustandsspektrum von HR leicht interpretieren. Die Retinalbanden zeigen im fingerprint-Bereich die gleiche Auffälligkeit wie in den Infrarotmessungen: Der linke Teil des Dreizacks fehlt und ist somit ebenfalls nicht ramanaktiv. Die Frequenz der C=C-Doppelbindung liegt wie im Infraroten leicht unterhalb der von BR bei 1522 cm⁻¹ und der zu noch höheren Frequenzen liegende Bereich zeigt ein analoges Muster und erlaubt das Ablesen der Frequenz der Schiffchen Base-Schwingung bei 1631 cm⁻¹.

5 Ergebnisse und Diskussion

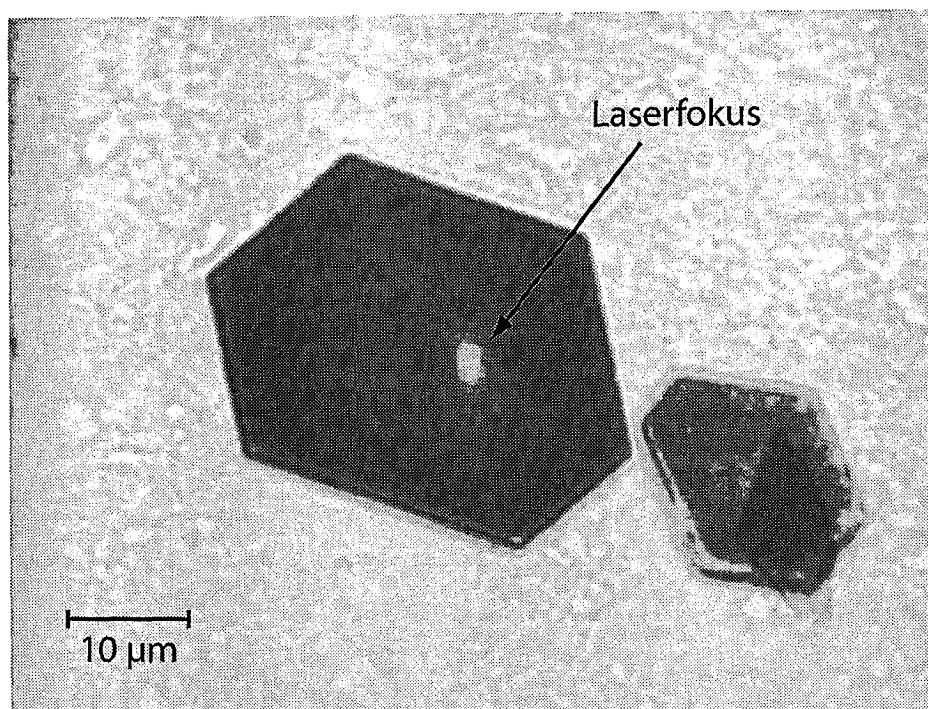


Abbildung 5.25 Photographie eines BR-Kristalls, die mit der integrierten CCD-Kamera aufgenommen wurde. An dem Kristall wurde vor der Aufnahme ein Raman-Spektrum gemessen, was sich an dem ausgebleichten Punkt zeigt. Allerdings lässt sich damit die Größe des Laserfokus auf ca. $2\text{ }\mu\text{m}$ abschätzen.

5.3.3 Mikro-Raman-Spektroskopie an Proteinkristallen

Das Ramanspektrometer benutzt, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, sowohl für die Fokussierung des Anregungslasers auf die Probe, als auch für das Sammeln des gestreuten Lichtes einen integrierten Mikroskopaufbau. Damit ermöglicht es die Aufnahme eines Ramanspektrums bei kleinsten Probenvolumina. Im Folgenden wird dies an Kristallen von Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin²⁴ demonstriert, die Abmessungen im Bereich von $20 \times 20 \times 2\text{ }\mu\text{m}^3$ besitzen.

BR-Kristalle

Abb. 5.25 zeigt die mit der integrierten CCD-Kamera aufgenommene Photographie eines BR-Kristalls, der mit einem Objektiv mit 50facher Vergrößerung vermessen wurde. Der markierte, ausgebleichte Punkt im Kristall zeigt einerseits, dass die Größe des Laserfokus im Bereich von $2\text{ }\mu\text{m}$ liegt, andererseits aber auch eine Schwierigkeit bei stationären Proben: Die deponierte Energie des Lasers ist so

²⁴ freundlicherweise überlassen von M. KOLBE *et. al.* [42]

5.3 Resonanz-Raman-Spektroskopie

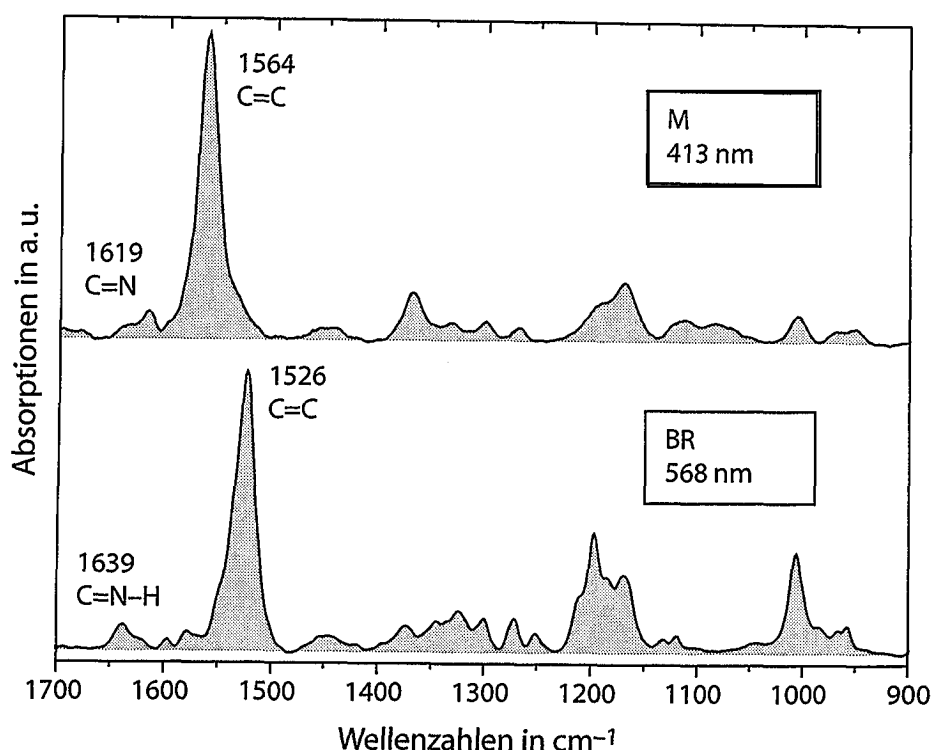


Abbildung 5.26 Resonanz-Raman-Messungen an den Bacteriorhodopsin-Kristallen von Abb. 5.25 bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen. Bei 413 nm wird aufgrund der Resonanzbedingung im Wesentlichen das M-Intermediat detektiert, 568 nm dagegen trifft genau in das Maximum der elektronischen Absorption des BR Grundzustandes.

hoch, dass das Protein in den meisten Fällen geschädigt wird. Dies lässt sich im Fall von BR entweder durch die Verwendung des 752 nm-Lasers verhindern, da weit genug vom Absorptionsmaximum eingestrahlt wird, oder man beschränkt die Leistung des Lasers und die Messdauer auf verträgliche Werte.

Abb. 5.26 zeigt zwei an diesen Kristallen aufgenommene Ramanspektren. Im oberen Teil findet man das Spektrum bei einer Anregungswellenlänge von 413 nm, bei der analog zu den BR-Durchflussmessungen in Abschnitt 5.3.1 fast ausschließlich das M-Intermediat detektiert wird. Ursache dafür ist im Wesentlichen die maximal-resonante Anregung dieser Population mit dem Peak der elektronischen Absorption bei 412 nm. Das untere Spektrum zeigt mit einem C=C-Doppelbindungsmaximum bei 1526 cm^{-1} ein Ramanspektrum des Grundzustandes, das bei einer Anregung von 568 nm gemessen wurde.

Im Rahmen des Signal/Rausch-Verhältnisses stimmen diese Spektren gut mit denjenigen aus den Durchflussmessungen überein (siehe Abb. 5.21). Allerdings

5 Ergebnisse und Diskussion

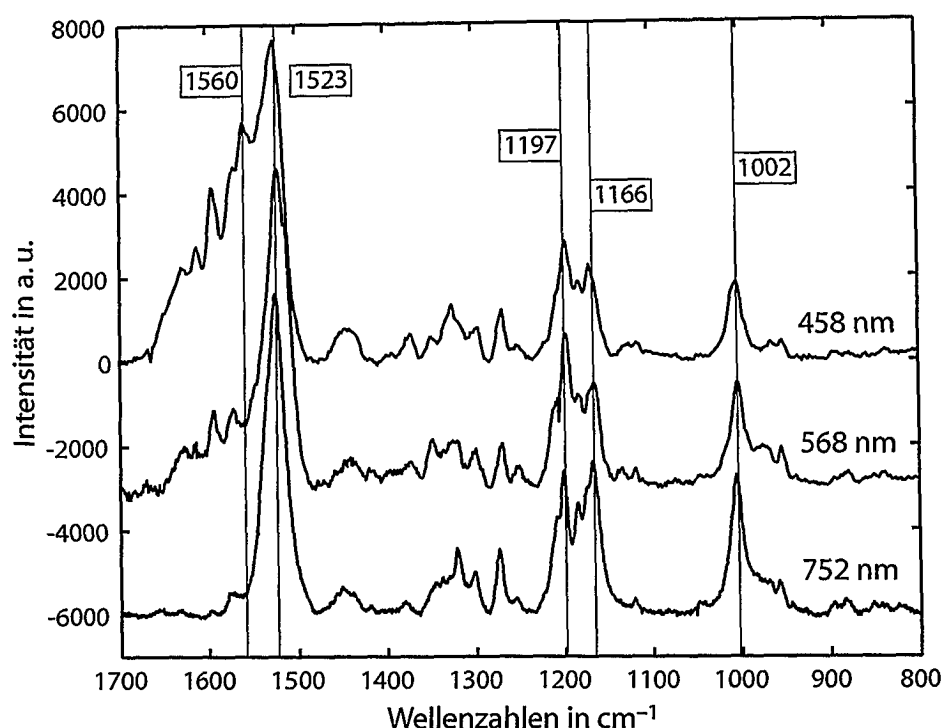


Abbildung 5.27 Resonanz-Raman-Messungen an Halorhodopsin-Kristallen mit drei verschiedenen Anregungswellenlängen. Der Kristall in kubischer Lipidphase wurde unter dem Mikroskop angefahren und anschließend mit dem Laserfokus im Inneren des Kristalls vermessen.

zeigen die Messungen an den Kristallen ein deutlich besseres Signal/Rausch-Verhältnis, was darauf zurückzuführen ist, dass die Proteinkonzentration im Kristallverband maximal ist.

HR-Kristalle

Abb. 5.27 zeigt drei Resonanz-Raman-Spektren bei verschiedenen Anregungswellenlängen, die mit dem Objektiv mit 50facher Vergrößerung von einem einzigen Kristall aufgenommen wurden. Die markierten Frequenzen der wichtigsten Retinalbanden stimmen untereinander und mit den Messungen am Proteinfilm überein. Allerdings ergeben sich vor allem im fingerprint-Bereich der C-C-Einfachbindungen erhebliche Unterschiede in der relativen Signalhöhe. Beispielsweise ist die im Infraroten gefundene negative Bande des Grundzustandes bei 1209 cm^{-1} (siehe Abb. 5.12, Seite 80) kaum ramanaktiv und zeigt sich nur als Schulter, die aber in den drei Spektren unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Das Maximum der C=C-Bindung liegt in allen drei Messungen bei 1523 cm^{-1} ,

5.3 Resonanz-Raman-Spektroskopie

der Frequenz des Grundzustandes, allerdings zeigt sich mit abnehmender Anregungswellenlänge die Ausbildung einer breiten Schulter zu höheren Frequenzen. Gleichzeitig erkennt man einerseits die bessere Detektion der Absorption der Schiff-schen Base, andererseits aber auch eine neu auftauchende Bande bei 1560 cm^{-1} . Da die Kristalle in einer hochmolaren Chloridkonzentration gewachsen sind und bei den Messungen im Infraroten festgestellt wurde, dass in diesem Fall das blauverschobene L-Intermediat mit einer Peakwellenlänge von 1553 cm^{-1} angeregt wird, ist eine Detektion dieses Zwischenzustandes nicht auszuschließen. Die Bande bei 1560 cm^{-1} im 458 nm -Spektrum könnte der Retinaldoppelbindungsschwingung in diesem Zustand entsprechen (Die Bande im Infraroten bei 1553 cm^{-1} wird von Änderungen im Amid II Bereich überlagert). Für dieses Argument spricht auch die relative Höhe der kleinen Bande zwischen 1197 cm^{-1} und 1166 cm^{-1} im fingerprint-Bereich, die dem positiven Peak bei 1188 cm^{-1} im IR-Spektrum entsprechen könnten.

Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass die extrem breite Schulter jenseits von 1523 cm^{-1} bei Anregungen mit kürzeren Wellenlängen vollständig von einem oder mehreren Intermediaten gebildet wird. Unter Umständen handelt es sich um eine in diesen Wellenlängenbereichen resonant angeregte Bande des Glasträgers, der charakteristische, sehr breite Ramanbanden zeigt.

5.3.4 Optische Falle mit Raman-Detektion

Der im vorigen Abschnitt benutzte Aufbau eignet sich neben der Detektion von kleinsten Objekten auch zu deren Manipulation: Mit Hilfe eines intensiven Lichtfeldes lässt sich auf ein Objekt eine Kraft ausüben, die im Fall eines fokussierten Laserstrahls und einem Brechungsindex des Objektes, der höher ist als der des umgebenden Mediums, vom Fokus aus in alle Richtungen rüktreibend ist. Dies wird in Abb. 5.28 für eine Auslenkung des Objektes nach unten demonstriert: Die Impulsänderungen der Photonen durch Brechung an der Kugeloberfläche sorgen aufgrund des Impulserhaltungssatzes für eine entgegengesetzte Kraftwirkung auf die Kugel. Analoge Betrachtungen für Auslenkungen in alle Raumrichtungen zeigen, dass diese Kraft immer in Richtung des Laserfokus rüktreibend ist, so dass mit der Kugelmittle im Fokus eine stabile Position erreicht ist. Damit eignet sich diese Konfiguration einerseits als optische Falle, um Teilchen festzuhalten, andererseits aber auch als optische Pinzette, um Objekte zu verschieben, zu deformieren oder um Kräfte auf sie einwirken zu lassen [91, 92]. Der im Rahmen dieser Arbeit benutzte Raman-Aufbau ermöglicht es, *gleichzeitig* ein Ramanspektrum von diesen Objekten aufnehmen zu können, um z.B. die eventuell induzierten Veränderungen spektroskopisch zu untersuchen.

Um diese Fähigkeiten der Apparatur zu demonstrieren, wurde versucht, Hefezellen in ihrem Kulturmedium mit dem Laser bei einer Wellenlänge von 752 nm einzufangen. Bei dieser Wellenlänge ist einerseits die Energiedeposition in die Pro-

5 Ergebnisse und Diskussion

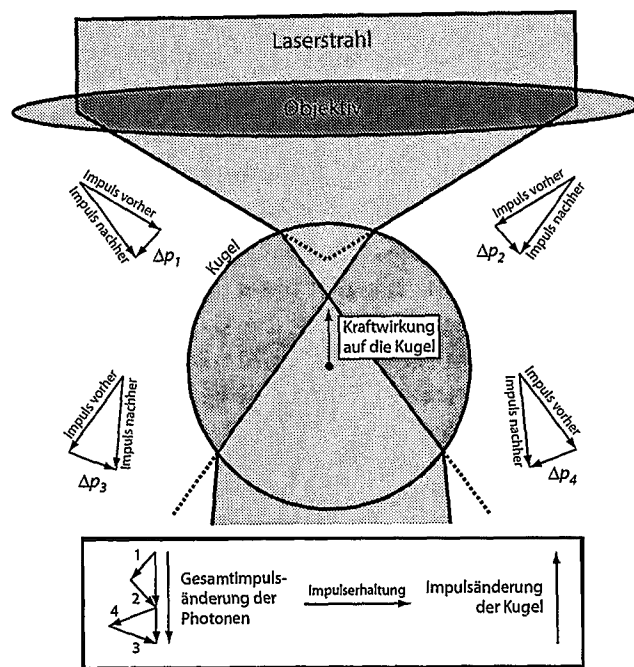


Abbildung 5.28 Prinzip der optischen Falle: Die auf das zu fangende Objekt auftreffenden Laserstrahlen werden an der Grenzfläche gebrochen und ändern damit ihren Impuls. Für die zwei äußeren Strahlen sind diese Impulsänderungen sowohl beim Eintritt als auch beim Austritt dargestellt. Werden die entsprechenden Vektoren aufaddiert, so ergibt sich eine Gesamtänderung des Impulses der Photonen nach unten und nach dem Impulserhaltungssatz somit eine Impulsänderung der Kugel nach oben. Eine analoge Betrachtung in alle Raumrichtungen zeigt, dass die Kraftwirkung in allen Fällen rücktreibend in Richtung des Laserfokus ist.

be und damit in das eingefangene Objekt relativ gering, andererseits lässt sich mit einem *cut-off*-Filter vor der beobachtenden CCD-Kamera das Laserlicht leicht unterdrücken.

Ein Tropfen des Mediums wurde auf einen Objektträger gegeben und das Immersionsobjektiv mit 90facher Vergrößerung in die Lösung gefahren. Per Handsteuerung des Objektisches konnten die einzelnen, spärlich verteilten Hefezellen verfolgt und eingefangen werden. Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt das Photo in Abb. 5.29, das mit der eingebauten CCD-Kamera aufgenommen wurde. Die ca. $5\mu\text{m}$ große Hefezelle im Bild wird von dem nicht sichtbaren Laserstrahl festgehalten. Die anhand von anderen vorbeischwimmenden Zellen beobachtbare Strömung im Tropfen hat relativ hohe Kräfte auf die Zelle zur Folge. Trotzdem reicht die am Objekt ankommende Leistung des Lasers aus²⁵, um die Zelle festzu-

²⁵ Die *nutzbare* Leistung ist bei diesem Experiment eingeschränkt: Die Leistung des Lasers darf am Notch-Filter (siehe Abb. 4.5, Seite 50) ca. 120 mW nicht dauerhaft überschreiten. Von

5.3 Resonanz-Raman-Spektroskopie

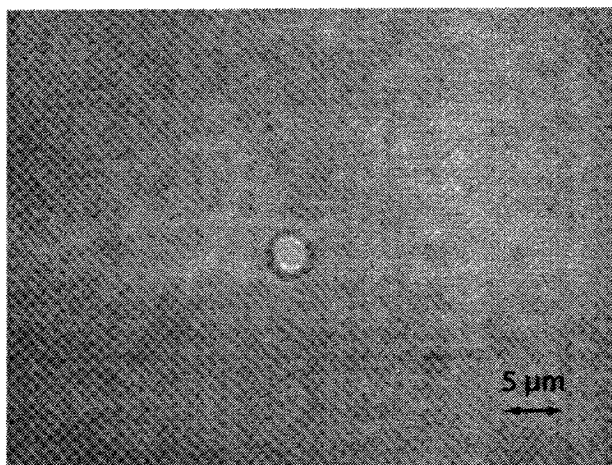


Abbildung 5.29 Photographie einer im Laserfokus gefangenen Hefezelle. Ein Tropfen Kulturmedium wurde mit dem Immersionsobjektiv angefahren und mittels Handsteuerung des xy-Tisches eine einzelne Zelle mit dem 752 nm Laser eingefangen.

halten.

In Abb. 5.30 ist das Ramanspektrum der eingefangenen Zelle sowie des Kulturmediums bei der Anregungswellenlänge von 752 nm dargestellt. Dazu wurde der zur Beobachtung über die CCD-Kamera nötige Strahlteiler aus dem Strahlengang herausgefahren, um das rückgestreute Licht komplett in den Spektrographen und auf den CCD-Chip zu bringen. Nützliche Folge ist die Vervielfachung der vom Laser auf das Objekt ausgeübten Kraft, so dass ein Verlust der unbeobachteten Hefezelle während der Messung unwahrscheinlich ist.

Die deutlichen Unterschiede in den Spektren von Abb. 5.30 bestätigen dies und machen deutlich, dass die Detektion von Objekten mit einer Größe im Mikrometerbereich auch dann möglich ist, wenn im Gegensatz zu den Kristallmessungen von Abschnitt 5.3.3 die Probenkonzentrationen nicht maximal sind. Eine Zuordnung der einzelnen Banden ist aufgrund des Gemisches von Ramanbanden und Resonanz-Raman-Banden einzelner Zellkomponenten nicht möglich.

dieser Leistung kommt allerdings nur ein Bruchteil an der Probe an, da einerseits Verluste im Mikroskop auftreten, andererseits aufgrund der gleichzeitigen Beobachtung über die CCD-Kamera ein Teiler im Strahlengang vorhanden sein muss, der nur extrem wenig Licht passieren lässt.

5 Ergebnisse und Diskussion

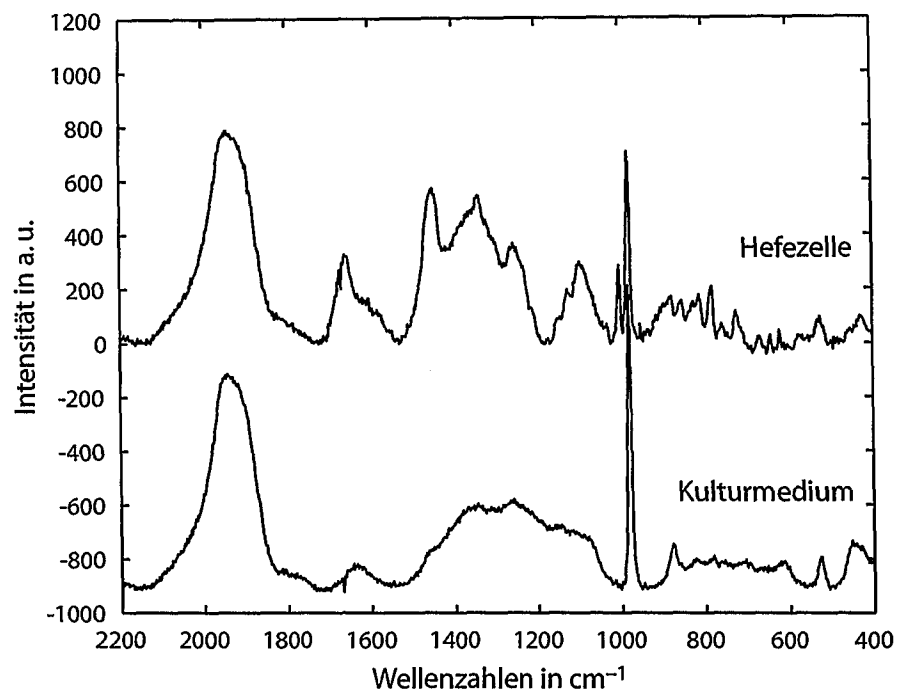


Abbildung 5.30 Ramanspektrum einer Hefezelle bei einer Anregungswellenlänge von 752 nm. Die Zelle wurde vom anregenden Laser nach Abb. 5.29 gleichzeitig festgehalten. Als Referenz zeigt die zweite Kurve das Spektrum des umgebenden Mediums.

6 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion der Ionenpumpen Bacterio- und Halorhodopsin fußen auf den vorgestellten methodischen Weiterentwicklungen der Infrarot- und Ramanspektroskopie: Ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis ist bei den *polarisierten* zeitauflösenden Messungen an BR Grundvoraussetzung und wurde durch die Verwendung einer neuartigen, kommerziell erhältlichen Diamant-ATR-Zelle sowie einer auf der Zeitachse logarithmisch getriggerten Datenaufnahme erreicht. Anhand der zeitaufgelösten FTIR-Messungen an HR konnte demonstriert werden, dass bei noch schwächeren Signalen eine einfache AC-Kopplung der Datenaufnahme ohne große Änderungen am Spektrometer möglich ist. Die Kombination des neu aufgebauten Ramanspektrometers mit zwei Lasern und insgesamt vier nutzbaren Laserwellenlängen, die den gesamten sichtbaren Spektralbereich abdecken, zeigt bei den vorgestellten Messungen an BR und HR im Durchfluss als auch an einzelnen Proteinkristallen sein Potential bei der Zuordnung von Absorptionen zu Schwingungsmoden.

Die ersten zeitaufgelösten FTIR-Messungen mit polarisiertem Messlicht an BR ermöglichen in der kinetischen Analyse eine ausgezeichnete Auftrennung in die Intermediate, deren größte Unterschiede im Gegensatz zu unpolarisierten Messungen nicht in den Retinalbanden sondern im Amid I Bereich liegen. Gerade im Übergang vom M- zum N-Intermediat finden sich hier Absorptionsänderungen, die aufgrund des starken Dichroismus auf Strukturänderungen des Proteinrückgrates zurückzuführen sind und in unpolarisierten Messungen teilweise gar nicht detektiert werden. Die anhand des Bandendichroismus berechneten Winkel der Übergangsdipolmomente der C-C-Einfachbindung des Retinals in L und N bestätigen durch signifikante Änderungen gegenüber dem Grundzustand die aus den Kristallstrukturen bekannte Streckung des Retinals im Bereich der Schiffchen Base. Die Winkelanalyse der C=O-Doppelbindungsabsorption von Asp 85 ermöglicht in Kombination mit den Röntgenstrukturdaten des M-Intermediates erstmals die Zuordnung des protonierten Sauerstoffs.

Die zeitauflösenden FTIR-Messungen an HR analysieren die Chloridabhängigkeit der Photozykluskinetik bei verschiedenen Konzentrationen. Bei steigender Molarität kann eine Beschleunigung des L-Aufbaus bei frühen und ein verlangsamter Zerfall bei späten Zeiten festgestellt werden. Dabei zeigt sich bei einer Chloridkonzentration von 5 mol/l eine Auftrennung des L-Zustandes in die Komponenten L₁

6 Zusammenfassung

und L_2 , die sich vor allem im Amid I Bereich deutlich unterscheiden. *Polarisierte* zeitaufgelöste Messungen bestätigen, wie im Fall von BR, Strukturänderungen des Proteinrückgrates am Ende des Zyklus als Ursache. Die Daten belegen eine Chloridionenaufnahme im Übergang von K nach L_1 und eine Abgabe zwischen L_2 und dem Grundzustand, im Gegensatz zum gängigen Literaturmodell.

Die Resonanz-Raman-Messungen an HR bei hoher Chloridkonzentration wurden analog zur ATR-Präparation an Purpurmembranfilmen durchgeführt und ermöglichen eine Zuordnung der Retinalbanden des Grundzustandes einschließlich der Frequenz der Schiffischen Base-Schwingung. Damit übereinstimmende Spektren, die an den Proteinkristallen von HR durchgeführt wurden, welche auch der Strukturbestimmung dienen [42], zeigen, dass diese in Übereinstimmung mit den Angaben des Kristallisationsmediums und der gefundenen Chloridbindestelle chloridbeladen sind. Abschließend demonstriert eine festgehaltene Hefezelle in Kulturmedium die Eignung des Ramanmikroskops als optische Falle, die gleichzeitig ein Ramanspektrum des gefangenen Objektes detektieren kann, und legt eine Erweiterung des Aufbaus zur Manipulation und paralleler Ramanbeobachtung der Auswirkungen nahe.

A Ergänzungen zu Kapitel 4

A.1 Step-scan Messungen mit AC-Kopplung

Für die folgende Anleitung wird davon ausgegangen, dass die OS/2 Software *Opus 2.3* auf dem Steuerungsrechner des *Bruker IFS 66v* installiert ist. Spätere Versionen, bzw. Versionen für andere Betriebssysteme, zeigen unter Umständen andere Fehler oder Eigenschaften, die die hier teilweise notwendigen Umwege überflüssig machen, bzw. neue verlangen.

Grundlegendes Problem ist es, die Kompatibilität von Referenz- und zeitaufgelöster Messung zu gewährleisten. Dies ist nur möglich, wenn zwischen den beiden Messungen der step-scan-Modus nicht verlassen wird (Die Benutzung des *align*-Modus zwischen den Messungen sollte also vermieden werden!) und damit exakt die gleichen Spiegelpositionen angefahren werden. Leider wird damit der Akquisitionsspeicher zwischen den Messungen nicht gelöscht, was zur Folge hat, dass die Anzahl der aufnehmbaren Zeitpunkte verringert werden muss (z.B. auf 500 statt standardmäßig 1000 im unteren Beispiel).

Ein Fehler in der Software verhindert, dass die elektronische Verstärkung zwischen den Messungen auf normalem Weg geändert werden kann. Die Optik-Einstellungen werden offensichtlich nicht neu ausgelesen. Dies ist der Grund für den *direct command entry* GNS=x mit der entsprechenden Verstärkung von Faktor 2^x .

Im folgenden also die entsprechende Vorgehensweise:

1. Grundeinstellungen

- Nur Interferogramme aufnehmen und speichern
- Im *align*-Modus die Peakposition speichern, sowie die DC-Verstärkung bestimmen (s.u.)
- In den FT-Parametern *Mertz/No Peak Search* einstellen
- elektronische Verstärkung auf 1 setzen
- Letzte Kontrolle im *align*-Modus

2. Referenz-Interferogramm DC-gekoppelt messen

- DC-Kopplung gegebenenfalls einstellen
- Über *Direct command entry* mit z.B. GNS=3 die DC-Verstärkung einstellen.

A Ergänzungen zu Kapitel 4

- Die Triggerverbindung zwischen Spektrometer und Laser trennen
- Step-scan mit folgenden Einstellungen starten

Time resolution	5 μ s
Number of time slices	100
Coaddition repeat count	10
Delay before experiment	0 ms
Stabilisation delay	100 ms
Experiment trigger	intern
Sampling trigger	intern

3. Zeitaufgelöste Interferogramme AC-gekoppelt messen

- Interferogramme der Referenzmessung überprüfen
- Die Triggerverbindung zwischen Spektrometer und Laser wieder schließen
- Die Kopplung auf AC stellen
- Über *Direct command entry* mit GNS=7 die AC-Verstärkung auf das Maximum stellen. Im allgemeinen sollten die Signale so klein sein, dass das Signal nicht übersteuert wird.
- Step-scan mit folgenden Einstellungen starten

Time resolution	5 μ s	
Number of time slices	500	
Coaddition repeat count	20	
Delay before experiment	225 ms	z.B.
Stabilisation delay	2000 ms	
Experiment trigger	intern	
Sampling trigger	intern	

Im Anschluss an die Messungen werden beide *files* für die Datenanalyse benötigt. Genaueres dazu findet sich in Abschnitt 4.1.7 auf Seite 45.

A.2 Zusammenfassung der Datenpunkte auf einer logarithmischen Skala

Die logarithmisch äquidistanten Zeitschritte ergeben sich rekursiv durch:

$$t_{n+1} = t_n \times 10^{\frac{1}{30}} \quad (\text{A.1})$$

Ein anderer Wert als 30 im Exponenten ändert entsprechend die Dichte der Punkte. Die Zusammenfassung der linear äquidistant aufgenommenen Daten erfolgt nach folgendem Schema:

- Berechne die *gewünschten* Zeitpunkte t_n nach der obigen Formel unter Berücksichtigung von 10 linearen Zeiten am Anfang. Mit letzterem wird sichergestellt, dass am Anfang nicht mehr Punkte erzeugt werden, als wirklich gemessen wurden. Nach der 10. Zeit werden dann aber immer mindestens 2 Messpunkte zusammengefasst und bilden einen gemittelten.
- Berechne das zu jedem logarithmischen Zeitpunkt t_n gehörende Zeitfenster mit den Grenzen unten_n und oben_n nach:

$$\text{unten}_n = t_{n-1} \times 10^{\frac{1}{2 \cdot 30}} \quad (\text{A.2})$$

$$\text{oben}_n = t_n \times 10^{\frac{1}{2 \cdot 30}} \quad (\text{A.3})$$

also die logarithmische Mitte zwischen den t_n 's.

- Middle die aufgenommen Daten, die zwischen unten_n und t_n liegen auf einer *linearen* Skala zum Punkt (Absunten_n, tunten_n).
- Middle die aufgenommen Daten, die zwischen t_n und oben_n liegen auf einer *linearen* Skala zum Punkt (Absoben_n, toben_n).
- Lege, wiederum auf einer linearen Skala, eine Gerade durch diese beiden Punkte und lese die Absorption am Zeitpunkt $t = t_n$ ab.

Es ergeben sich die gemittelten und entsprechend interpolierten Daten für alle logarithmischen Zeitpunkte t_n .

Da dieser Algorithmus nicht davon ausgeht, dass die Messpunkte äquidistant aufgenommen wurden, lässt er sich auf beliebige Messreihen anwenden und wird deshalb auch bei der Zusammenfassung von bereits quasi-logarithmisch aufgenommenen Werten benutzt.

A.3 Numerische Beschreibung der Daten

Die Rohdaten seien in einer Matrix $\mathbf{A}$ abgelegt, die die Spektren in den Spalten und die Zeitverläufe in den Zeilen enthält. Eine Singulärwertzerlegung liefert:

$$\mathbf{A} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{V}' \quad (\text{A.4})$$

In Summenschreibweise ergibt dies unter der Voraussetzung einer diagonalen $\mathbf{S}$ -Matrix, 5 signifikanter Komponenten und von Zeitverläufen, die sich durch eine Summe von Exponentialfunktionen darstellen lassen:

$$\mathbf{A}_{ij} = \sum_k \mathbf{U}_{ik} \mathbf{S}_k \mathbf{V}'_{kj} \quad (\text{A.5})$$

$$\approx \sum_{k \leq 5} \mathbf{U}_{ik} \mathbf{S}_k \mathbf{V}'_{kj} \quad (\text{A.6})$$

$$= \sum_{k \leq 5} \mathbf{U}_{ik} \sum_z \mathbf{Amp}_{kz} e^{-\frac{t_j}{\tau_z}} \quad (\text{A.7})$$

$$= \sum_z \sum_{k \leq 5} \mathbf{U}_{ik} \mathbf{Amp}_{kz} e^{-\frac{t_j}{\tau_z}} \quad (\text{A.8})$$

$$= \sum_z e^{-\frac{t_j}{\tau_z}} \sum_{k \leq 5} \mathbf{U}_{ik} \mathbf{Amp}_{kz} \quad (\text{A.9})$$

Bildet man nun die Matrix der e-Funktionen

$$\mathbf{R}_{zj} = e^{-\frac{t_j}{\tau_z}} \quad (\text{A.10})$$

mit den einzelnen Zeitverläufen als Zeilen der Matrix, und die Matrix

$$\mathbf{Q}_{iz} = \sum_{k \leq 5} \mathbf{U}_{ik} \mathbf{Amp}_{kz} \quad (\text{A.11})$$

so ergibt sich

$$\mathbf{A}_{ij} = \sum_z \mathbf{Q}_{iz} \mathbf{R}_{zj} \quad (\text{A.12})$$

oder in Matrixschreibweise

$$\mathbf{A} = \mathbf{Q} \cdot \mathbf{R} \quad (\text{A.13})$$

In dieser reduzierten Darstellung, die aus dem Fit hervorgeht, lässt sich die Absorptionsmatrix also darstellen als ein Produkt aus der Matrix der exponentiellen Zeitverläufe und der Matrix der sogenannten Amplitudenspektren $\mathbf{Q}$. Nach Gleichung A.11 ergibt sich $\mathbf{Q}$ aus einer Multiplikation von $\mathbf{U}$, der Matrix der orthonormalen Basisvektoren des Spektrenraumes, mit der Matrix $\mathbf{Amp}$ aus den Amplituden der Exponentialfunktionen der einzelnen Zeitverläufe. Es entsteht eine neue Basis des Spektrenraumes, die im allgemeinen nicht orthogonal, geschweige denn orthonormal ist, aber eine kinetische Grundlage hat: Setzt man beispielsweise ein sequentielles kinetisches Modell als Grundlage voraus, so entsprechen die Amplitudenspektren in $\mathbf{Q}$ Differenzspektren zwischen den einzelnen Intermediaten.

Fitprozedur

Wie in Gleichung A.7 deutlich wird, müssen die fünf Zeitverläufe der signifikanten Komponenten durch eine Summe von $z_{\max}$ Exponentialfunktionen dargestellt werden. In Matrixschreibweise also

$$\mathbf{Amp} \cdot \mathbf{Exp} \stackrel{!}{=} \mathbf{V}'_{\text{sig}} \quad (\text{A.14})$$

wenn $\mathbf{Exp}$ die Matrix ist, die die exponentiellen Verläufe der $z_{\max}$ verschiedenen Zeitkonstanten in den Zeilen darstellt.

Die Matlab-toolbox *solvopt* benötigt nun für einen nichtlinearen Fit eine zu minimierende Funktion, in unserem Fall die Summe der quadratischen Abweichungen, wenn

$$\mathbf{Abweich} = \mathbf{Amp} \cdot \mathbf{Exp} - \mathbf{V}'_{\text{sig}} \quad (\text{A.15})$$

Die Parameter, die *solvopt* dabei variieren muss, beschränken sich auf die Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen in $\mathbf{Exp}$, da die Amplituden der e-Funktionen in einem linearen Zusammenhang stehen und somit analytisch berechnet werden können. Bei vorgegebenen τ 's ergibt sich per Regression genau eine optimale Lösung für die Amplituden. Somit folgt aus $\mathbf{Exp}$ direkt die Matrix $\mathbf{Amp}$ und die zu minimierende Funktion lässt sich berechnen. Nach einem speziellen Algorithmus variiert *solvopt* nun die Parameter und folgt dem Gradienten zu einer möglichst guten Lösung. Im Gegensatz zum linearen Fit der Amplituden kann allerdings eine übersehene, bessere Lösung nicht ausgeschlossen werden.

A Ergänzungen zu Kapitel 4

Literaturverzeichnis

- [1] OESTERHELT, D. und W. STOECKENIUS: *Rhodopsin-Like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium Halobium*. Nat. New Biol., 233(39):149–152, 1971.
- [2] OESTERHELT, D.: *The Purple Membrane of Halobacterium Halobium: A New System for Light Energy Conversion*. Ciba Found Symp, 31:147–167, 1975.
- [3] OESTERHELT, D.: *The Purple Membrane from Halobacterium Halobium*. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 353(10):1554–1555, 1972.
- [4] MICHEL, H., D. OESTERHELT und R. HENDERSON: *Orthorhombic Two-Dimensional Crystal Form of Purple Membrane*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(1):338–342, 1980.
- [5] MICHEL, H. und D. OESTERHELT: *Three-Dimensional Crystals of Membrane Proteins: Bacteriorhodopsin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(3):1283–1285, 1980.
- [6] BALDWIN, J. M., R. HENDERSON, E. BECKMAN und F. ZEMLIN: *Images of Purple Membrane at 2.8 Å Resolution Obtained by Cryo-Electron Microscopy*. J. Mol. Biol., 202(3):585–591, 1988.
- [7] LANDAU, E. M. und J. P. ROSENBUSCH: *Lipidic Cubic Phases: A Novel Concept for the Crystallization of Membrane Proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(25):14532–14535, 1996.
- [8] RUMMEL, G., A. HARDMEYER, C. WIDMER, M. L. CHIU, P. NOLLERT, K. P. LOCHER, I. PEDRUZZI, E. M. LANDAU und J. P. ROSENBUSCH: *Lipidic Cubic Phases: New Matrices for the Three-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins*. J. Struct. Biol., 121(2):82–91, 1998.
- [9] PEBAY-PEYROULA, E., G. RUMMEL, J. P. ROSENBUSCH und E. M. LANDAU: *X-Ray Structure of Bacteriorhodopsin at 2.5 Ångströms from Microcrystals Grown in Lipidic Cubic Phases*. Science, 277(5332):1676–1681, 1997.
- [10] LUECKE, H., H. T. RICHTER und J. K. LANYI: *Proton Transfer Pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Ångström Resolution*. Science, 280(5371):1934–1937, 1998.

Literaturverzeichnis

- [11] LUECKE, H., B. SCHOBERT, H. T. RICHTER, J. P. CARTAILLER und J. K. LANYI: *Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å Resolution*. J. Mol. Biol., 291(4):899–911, 1999.
- [12] ESSEN, L., R. SIEGERT, W. D. LEHMANN und D. OESTERHELT: *Lipid Patches in Membrane Protein Oligomers: Crystal Structure of the Bacteriorhodopsin-Lipid Complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(20):11673–11678, 1998.
- [13] TAKEDA, K., H. SATO, T. HINO, M. KONO, K. FUKUDA, I. SAKURAI, T. OKADA und T. KOUYAMA: *A Novel Three-Dimensional Crystal of Bacteriorhodopsin Obtained by Successive Fusion of the Vesicular Assemblies*. J. Mol. Biol., 283(2):463–474, 1998.
- [14] BELRHALI, H., P. NOLLERT, A. ROYANT, C. MENZEL, J. P. ROSENBUSCH, E. M. LANDAU und E. PEBAY-PEYROULA: *Protein, Lipid and Water Organization in Bacteriorhodopsin Crystals: A Molecular View of the Purple Membrane at 1.9 Å Resolution*. Structure Fold. Des., 7(8):909–917, 1999.
- [15] SASS, H. J., G. BÜLDT, R. GESSENICH, D. HEHN, D. NEFF, R. SCHLESINGER, J. BERENDZEN und P. ORMOS: *Structural Alterations for Proton Translocation in the M State of Wild-Type Bacteriorhodopsin*. Nature, 406:649–653, 2000.
- [16] HEBERLE, J., G. BÜLDT, E. KOGLIN, J. P. ROSENBUSCH und E. M. LANDAU: *Assessing the Functionality of a Membrane Protein in a Three-Dimensional Crystal*. J. Mol. Biol., 281(4):587–592, 1998.
- [17] SCHERRER, P., M. K. MATHEW, W. SPERLING und W. STOECKENIUS: *Retinal Isomer Ratio in Dark-Adapted Purple Membrane and Bacteriorhodopsin Monomers*. Biochemistry, 28(2):829–834, 1989.
- [18] NUSS, M. C., W. ZINTH, W. KAISER, E. KOELLING und D. OESTERHELT. Chem. Phys. Lett., 117:1–7, 1985.
- [19] BRAIMAN, M. S., T. MOGI, T. MARTI, L. J. STERN, H. G. KHORANA und 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(23):8516–8520, 1988.
- [20] HEBERLE, J. und N. A. DENCHER: *Bacteriorhodopsin in Ice: Accelerated Proton Transfer from the Purple Membrane Surface*. FEBS Letters, 277:277–280, 1990.

- [21] BUTT, H. J., K. FENDLER, E. BAMBERG, J. TITTOR und D. OESTERHELT: *Aspartic Acids 96 and 85 Play a Central Role in the Function of Bacteriorhodopsin as a Proton Pump*. EMBO J., 8(6):1657–1663, 1989.
- [22] OTTO, H., T. MARTI, M. HOLZ, T. MOGI, M. LINDAU, H. G. KHORANA und M. P. HEYN: *Aspartic Acid-96 is the Internal Proton Donor in the Re-protonation of the Schiff Base of Bacteriorhodopsin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9228–9232, 1989.
- [23] GERWERT, K., G. SOUVIGNIER und B. HESS: *Simultaneous Monitoring of Light-Induced Changes in Protein Side-Group Protonation by Time Resolved Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9774–9778, 1990.
- [24] HESSLING, B., G. SOUVIGNIER und K. GERWERT: *A Model—Independent Approach to Assigning Bacteriorhodopsin's Intramolecular Reactions to Photocycle Intermediates*. Biophys. J., 65(5):1929–1941, 1993.
- [25] SMITH, S. O., J. A. PARDOEN, P. P. MULDER, B. CURRY, J. LUGTENBURG und R. A. MATHIES. Biochemistry, 22:6141–6148, 1983.
- [26] ROYANT, A., K. EDMAN, T. URSBY, E. PEBAY-PEYROULA, E. M. LANDAU und R. NEUTZE: *Helix Deformation is Coupled to Vectorial Proton Transport in the Photocycle of Bacteriorhodopsin*. Nature, 406:645–648, 2000.
- [27] EDMAN, K., P. NOLLERT, A. ROYANT, H. BELRHALI, E. PEBAY-PEYROULA, J. HAJDU, R. NEUTZE und E. M. LANDAU: *High-Resolution X-Ray Structure of an Early Intermediate in the Bacteriorhodopsin Photocycle*. Nature, 401(6755):822–826, 1999.
- [28] LUECKE, H., B. SCHOBERT, H. T. RICHTER, J. P. CARTAILLER und J. K. LANYI: *Structural Changes in Bacteriorhodopsin During Ion Transport at 2 Ångström Resolution*. Science, 286(5438):255–261, 1999.
- [29] SCHARNAGL, C. und S. F. FISCHER: *Conformational Flexibility of Arginine-82 as Source for the Heterogeneous and pH-Dependent Kinetics of the Primary Proton Transfer Step in the Bacteriorhodopsin Photocycle: An Electrostatic Model*. Chem. Phys., 212:231–246, 1996.
- [30] DIOUMAEV, A. K., H. T. RICHTER, L. S. BROWN, M. TANIO, S. TUZI, H. SAITO, Y. KIMURA, R. NEEDLEMAN und J. K. LANYI: *Existence of a Proton Transfer Chain in Bacteriorhodopsin: Participation of Glu-194 in the Release of Protons to the Extracellular Surface*. Biochemistry, 37(8):2496–2506, 1998.

Literaturverzeichnis

- [31] ZSCHERP, C., R. SCHLESINGER, J. TITTOR, D. OESTERHELT und J. HEBERLE: *In situ determination of transient pKa changes of internal amino acids of bacteriorhodopsin by using time-resolved attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(10):5498–5503, 1999.
- [32] RAMMELSBERG, R., G. HUHN, M. LÜBBEN und K. GERWERT: *Bacteriorhodopsin's Intramolecular Proton-Release Pathway Consists of a Hydrogen-Bonded Network*. Biochemistry, 37(14):5001–5009, 1998.
- [33] ZSCHERP, C., R. SCHLESINGER und J. HEBERLE: *Time-Resolved FT-IR Spectroscopic Investigation of the pH-Dependent Proton Transfer Reactions in the E194Q Mutant of Bacteriorhodopsin*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 283(1):57–63, 2001.
- [34] RIESLE, J., D. OESTERHELT, N. A. DENCHER und J. HEBERLE: *D38 is an Essential Part of the Proton Translocation Pathway in Bacteriorhodopsin*. Biochemistry, 35(21):6635–6643, 1996.
- [35] KANNER, B. und E. RACKER. Biochem. Biophys. Res. Commun., 64:1054, 1975.
- [36] LINDLAY, E. und R. MACDONALD. Biochem. Biophys. Res. Commun., 88:491, 1979.
- [37] MATSUNO-YAGI, A. und Y. MUKOHATA: *ATP Synthesis Linked to Light-Dependent Proton Uptake in a Rad Mutant Strain of Halobacterium Lacking Bacteriorhodopsin*. Arch. Biochem. Biophys., 199(1):297–303, 1980.
- [38] MUKOHATA, Y., A. MATSUNO-YAGI und Y. KAJI. In: *Saline Environment*, Seite 31. Business Centre Acad. Soc. Tokio, 1980.
- [39] SCHOBERT, B. und J. K. LANYI: *Halorhodopsin is a Light-Driven Chloride Pump*. J. Biol. Chem., 257(17):10306–10313, 1982.
- [40] LANYI, J. K.: *Halorhodopsin, a Light-Driven Electrogenic Chloride-Transport System*. Physiol. Rev., 70(2):319–330, 1990.
- [41] OESTERHELT, D.: *Structure and Function of Halorhodopsin*. Isr. J. Chem., 35:475–494, 1995.
- [42] KOLBE, M., H. BESIR, L. O. ESSEN und D. OESTERHELT: *Structure of the Light-Driven Chloride Pump Halorhodopsin at 1.8 Å Resolution*. Science, 288(5470):1390–1396, 2000.

- [43] OESTERHELT, D., P. HEGEMANN und J. TITTOR: *The Photocycle of the Chloride Pump Halorhodopsin. II. Quantum Yields and a Kinetic Model*. EMBO J., 4:2351–2356, 1985.
- [44] VARO, G., L. ZIMANYI, X. FAN, L. SUN, R. NEEDLEMAN und J. K. LANYI: *Photocycle of Halorhodopsin from Halobacterium Salinarium*. Biophys. J., 68(5):2062–2072, 1995.
- [45] TITTOR, J., D. OESTERHELT, R. MAURER, H. DESEL und R. UHL: *The Photochemical Cycle of Halorhodopsin: Absolute Spectra of Intermediates Obtained by Flash Photolysis and Fast Difference Spectra Measurements*. Biophys. J., 52:999–1006, 1987.
- [46] FODOR, S. P., R. A. BOGOMOLNI und R. A. MATHIES: *Structure of the Retinal Chromophore in the hRL Intermediate of Halorhodopsin From Resonance Raman Spectroscopy*. Biochemistry, 26(21):6775–6778, 1987.
- [47] CHON, Y., H. KANDORI, J. SASAKI, J. K. LANYI, R. NEEDLEMAN und A. MAEDA: *Existence of Two Photointermediates of Halorhodopsin from Halobacterium salinarum, Differing in Their Protein and Water FTIR Bands*. Biochem., 38:9449–9455, 1999.
- [48] HERRES, W. und J. GRONHOLZ: *Datenverarbeitung in der FT-IR-Spektroskopie*. Comp. Anw. Lab., 5:352–356, 1985.
- [49] RAMMELSBERG, R., S. BOULAS, H. CHORONGIEWSKI und K. GERWERT: *Set-Up for Time-Resolved Step-Scan FTIR Spectroscopy of Noncyclic Reactions*. Vib. Spectrosc., 19(1):143–149, 1999.
- [50] RODIG, C. und F. SIEBERT: *Monitoring Fast Reactions of Slow Cycling Systems With Time-Resolved FTIR Spectroscopy*. Vib. Spectrosc., 19(2):271–276, 1999.
- [51] HEBERLE, J. und C. ZSCHERP: *ATR/FT-IR Difference Spectroscopy of Biological Matter with Microsecond Time Resolution*. Appl. Spectrosc., 50(5):588–596, 1996.
- [52] ZSCHERP, C. und J. HEBERLE: *Infrared difference spectra of the intermediates L, M, N, and O of the bacteriorhodopsin photoreaction obtained by time-resolved attenuated total reflection spectroscopy*. J Phys Chem B, 101(49):10542–10547, 1997.
- [53] HARRICK, N. J.: *Internal Reflection Spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York, 1967.

Literaturverzeichnis

- [54] GOORMAGHTIGH, E. und J. M. RUYSSCHAERT: *Molecular Description of Biological Membranes by Computer Aided Conformational Analysis*. Kapitel 10, Seiten 285–329. CRC Press, 1990.
- [55] MARSH, D., M. MULLER und F. J. SCHMITT: *Orientation of the infrared transition moments for an alpha-helix*. Biophys J, 78:2499–2510, 2000.
- [56] MARSH, D. und T. PALI: *Infrared Dichroism from the X-Ray Structure of Bacteriorhodopsin*. Biophys. J., 80(1):305–312, 2001.
- [57] MANNING, J. C. und P. R. GRIFFITHS: *Noise Sources in Step-Scan FT-IR Spectrometry*. Appl. Spectrosc., 51(8):1092–1101, 1997.
- [58] MCNAMARA, K. M., B. E. SCRUGGS und K. K. GLEASON: *The Effect of Impurities on the IR Absorption of Chemically Vapor Deposited Diamond*. Thin Solid Films, 253:157–161, 1994.
- [59] ZSCHERP, C.: *Der Protonentransport durch das Membranprotein Bacteriorhodopsin, untersucht mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie*. Doktorarbeit, Universität Düsseldorf, 1997.
- [60] MACBRIDE, D. M., C. G. MALONE, J. P. HEBB und E. G. CRAVALLO: *Effect of Temperature Variation on FT-IR Spectrometer Stability*. Appl. Spectrosc., 51(1):43–50, 1997.
- [61] RÖDIG, C. und F. SIEBERT: *Errors and Artifacts in Time-Resolved Step-Scan FT-IR Spectroscopy*. Appl. Spectrosc., 53(8):893–901, 1999.
- [62] RAMMELSBERG, R.: *Untersuchung der Protonentransfer-Reaktionen in Bacteriorhodopsin mittels zeitauflösender Step-Scan FT-IR Spektroskopie*. Doktorarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 1999.
- [63] RÖDIG, C., I. CHIZHOV, O. WEIDLICH und F. SIEBERT: *Time-Resolved Step-Scan Fourier Transform Infrared Spectroscopy Reveals Differences between Early and Late M Intermediates of Bacteriorhodopsin*. Biophys. J., 76(5):2687–2701, 1999.
- [64] UHMANN, W., A. BECKER, C. TARAN und F. SIEBERT: *Time-Resolved FT-IR Absorption Spectroscopy Using a Step-Scan Interferometer*. Appl Spectrosc, 45:390–397, 1991.
- [65] KUNTSEVICH, A. und F. KAPPEL: *SolvOpt: The Solver for Local Nonlinear Optimization Problems*.
<http://www.uni-graz.at/imawww/kuntsevich/solvopt/index.html>, 1997.
- [66] HECHT, E.: *Optics*. Addison-Wesley, Reading, 1997.

- [67] VENYAMINOV, S. YU. und N. N. KALNIN: *Quantitative IR Spectrophotometry of Peptide Compounds in Water (H₂O) Solutions. II. Amide Absorption Bands of Polypeptides and Fibrous Proteins in α -, β -, and Random Coil Conformations*. Biopolymers, 30(13-14):1259–71, 1990.
- [68] STUART, BARBARA: *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester, 1997.
- [69] TAMM, L. K. und S. A. TATULIAN: *Infrared Spectroscopy of Proteins and Peptides in Lipid Bilayers*. Q. Rev. Biophys., 30(4):365–429, November 1997.
- [70] GOORMAGHTIGH, E., V. RAUSSENS und J. M. RUYSSCHAERT: *Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy of Proteins and Lipids in Biological Membranes*. Biochim. Biophys. Acta, 1422(2):105–185, 1999.
- [71] BERTIE, JOHN E. und ZHIDA LAN: *Infrared Intensities of Liquids XX: The Intensity of the OH Stretching Band of Liquid Water Revisited, and the Best Current Values of the Optical Constants of H₂O(l) at 25°C between 15,000 and 1 cm⁻¹*. Appl. Spec., 50:1047–1057, 1996.
- [72] HENDERSON, R. und P. N. UNWIN: *Structure of the purple membrane from Halobacterium halobium*. Biophys Struct Mech, 3(2):121, 1977.
- [73] SMITH, S. O., M. S. BRAIMAN, A. B. MYERS, J. A. PARDOEN, J. M. L. COURTIN, C. WINKEL, J. LUGTENBURG und R. A. MATHIES: *Vibrational Analysis of the all-trans-Retinal Chromophore in Light-Adapted Bacteriorhodopsin*. J. Am. Chem. Soc., 109:3108–3125, 1987.
- [74] HEYN, M. P., B. BORUCKI und H. OTTO: *Chromophore Reorientation During the Photocycle of Bacteriorhodopsin: Experimental Methods and Functional Significance*. Biochim. Biophys. Acta, 1460(1):60–74, 2000.
- [75] EARNEST, T. N., P. ROEPE, M. S. BRAIMAN, J. GILLESPIE und K. J. ROTHCHILD: *Orientation of the Bacteriorhodopsin Chromophore Probed by Polarized Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy*. Biochemistry, 25(24):7793–7798, 1986.
- [76] NABEDRYK, E. und J. BRETON: *Polarized Fourier Transform Infrared (FTIR) Difference Spectroscopy of the M₄₁₂ Intermediate in the Bacteriorhodopsin Photocycle*. FEBS Lett., 202(2):356–360, 1986.
- [77] NABEDRYK, E. und J. BRETON: *Light-Induced Polarized Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Bacteriorhodopsin — a Study of the M₄₁₂ Intermediate by Photoselection*. Biochim. Biophys. Acta, 973:13–18, 1989.

Literaturverzeichnis

- [78] EISFELD, W., C. PUSCH, R. DILLER, R. LOHRMANN und M. STOCKBURGER: *Resonance Raman and Optical Transient Studies on the Light-Induced Proton Pump of Bacteriorhodopsin Reveal Parallel Photocycles*. Biochemistry, 32(28):7196–7215, 1993.
- [79] EISFELD, W.: *Untersuchung der lichtinduzierten Reaktionswege von Bacteriorhodopsin und seiner Mutante D96N mit zeitaufgelöster Absorptions- und Resonanz-Raman-Spektroskopie*. Doktorarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, 1994.
- [80] STOCKBURGER, M., T. ALSHUTH, D. OESTERHELT und W. GÄRTNER: *Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin: Structure and Function*. In: *Spectroscopy of Biological Systems*, Kapitel 10, Seiten 483–535. John Wiley & Sons, 1986.
- [81] KANDORI, H.: *Polarized FTIR Spectroscopy Distinguishes Peptide Backbone Changes in the M and N Photointermediates of Bacteriorhodopsin*. J. Am. Chem. Soc., 120:4546–4547, 1998.
- [82] LANYI, J. K.: *Photochromism of Halorhodopsin. cis/trans Isomerization of the Retinal Around the 13–14 Double Bond*. J Biol Chem, 261(30):14025–14030, 1986.
- [83] MAEDA, A., T. OGURUSU, T. YOSHIZAWA und T. KITAGAWA: *Resonance Raman Study on Binding of Chloride to the Chromophore of Halorhodopsin*. Biochem., 24:2517–2521, 1985.
- [84] HEYMANN, J. A., W. A. HAVELKA und D. OESTERHELT: *Homologous Overexpression of a Light-Driven Anion Pump in an Archaeobacterium*. Mol. Microbiol., 7(4):623–630, 1993.
- [85] BOLWIEN, C., D. FASTERMANN und J. HEBERLE: *Chloride Uptake and Release by Halorhodopsin Investigated by Time-Resolving ATR/FTIR Spectroscopy*. In Vorbereitung.
- [86] FASTERMANN, D. Doktorarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. In Vorbereitung.
- [87] HEGEMANN, P., D. OESTERHELT und M. STEINER: *The Photocycle of the Chloride Pump Halorhodopsin. I. Azide-Catalyzed Deprotonation of the Chromophore is a Side Reaction of Photocycle Intermediates Inactivating the Pump*. EMBO J., 4:2347–2350, 1985.
- [88] ZIMÁNYI, L., L. KESZTHELYI und J. K. LANYI: *Transient Spectroscopy of Bacterial Rhodopsins with an Optical Multichannel Analyzer. 1. Comparison*

of the Photocycles of Bacteriorhodopsin and Halorhodopsin. Biochemistry, 28(12):5165–5172, 1989.

- [89] HUTSON, M. S., S. V. SHILOV, R. KREBS und M. S. BRAIMAN: *Halide Dependence of the Halorhodopsin Photocycle as Measured by Time-Resolved Infrared Spectra.* Biophys. J., 80:1452–1465, 2001.
- [90] OKUNO, D., M. ASAUMI und E. MUNIYUKI: *Chloride Concentration Dependency of the Electrogenic Activity of Halorhodopsin.* Biochem., 38:5422–5429, 1999.
- [91] ASHKIN, A. und J. M. DZIEDZIC: *Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria.* Science, 235:1517–1520, 1986.
- [92] ASHKIN, A., J. M. DZIEDZIC und T. YAMANE: *Optical Trapping and Manipulation of Single Cells Using Infrared Laser Beams.* Nature, 330:769–771, 1987.

Literaturverzeichnis

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jene erwähnen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein herzlicher Dank gilt:

Dr. J. Heberle für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, zahllose anregende Diskussionen und die Möglichkeit, in seiner Gruppe so viele spektroskopische Techniken kennen zu lernen.

Prof. Dr. G. Büldt für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können, die angenehmen Arbeitsbedingungen an seinem Institut und das Interesse an diesem Thema.

Rebecca Nyquist und Dirk Heitbrink für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das ganze Drumherum.

Dirk Fastermann für die Zusammenarbeit bei allem, was mit Halorhodopsin zu tun hatte und Dominic Hehn für technische und physikalische Diskussionen.

Birgit Gehrman für ihre unverzichtbare Hilfe beim Ausfüllen der Reiseanträge und ihr Engagement — gerade in letzter Zeit — im Kampf mit der Verwaltung.

Rainer Kofahl und Sascha Lehmann für die technische Unterstützung.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe am IBI-2 für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, viele Hilfen und die Einblicke in verschiedene Arbeitsbereiche eines fächerübergreifenden Instituts.

Meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung bei allem.

Meiner Tante und meinem Onkel für die fortgesetzten finanziellen und moralischen Hilfen.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3945
Januar 2002
ISSN 0944-2952