

Teilprojekt B 3: Ultrakurzzeitdynamik von Photoreaktionen in nativer und synthetischer Proteinumgebung

Teilprojektleiter: **Prof. Dr. D. Stehlik**

Dienstanschrift: **Freie Universität Berlin, Institut für Experimentalphysik,
Arnimallee 14, 14195 Berlin**

Kommunikation: Tel: 0049 30 838 55069 FAX: 0049 30 838 56081
E-Mail: stehlik@physik.fu-berlin.de
Internet: <http://www.physik.fu-berlin.de/~ag-stehlik/shomepage.html>

Teilprojektleiter: **Prof. Dr. R. Diller (seit Februar 2003 Prof. am Fachbereich Physik
der Technischen Universität Kaiserslautern)**

Dienstanschrift: FB Physik, TU Kaiserslautern, Erwin Schrödinger Str. Geb. 46,
67663 Kaiserslautern

Kommunikation: Tel: 0049 631 205-2323 FAX: 0049 631 205-3902
E-Mail: diller@physik.uni-kl.de
Internet: <http://www.physik.uni-kl.de/diller/>

Fachgebiet und
Arbeitsrichtung: **Experimentalphysik
Ultrakurzzeitspektroskopie, Biologische Photosysteme**

Keywords: Femtosecond pump-probe-spectroscopy, photoinduced processes in
chromoproteins, reaction dynamics, vibrational (IR) and optical
spectroscopy.

Summary of results obtained during the second period, July 2001 - June 2004

Highlights of the second period were the results obtained by ultrafast IR-vibrational spectroscopy after electronic excitation. For the first time it could be shown by monitoring directly structure-specific vibrational marker bands of bacteriorhodopsin, that the retinal-chromophore all-trans to 13-cis isomerization occurs with a time constant of 500 fs (Herbst, Heyne, Diller, *Science* 297, 822 (2002)).

By means of corresponding experiments on the primary reaction of halorhodopsin, we could characterize different reaction pathways on the chromophore S_1 - surface. The IR-experiments reveal new information on molecular dynamics of retinal proteins necessary for a

general understanding of photoinduced isomerization reactions in a catalytic protein environment.

We extended our ultrafast pump-probe experiments on the cyanobacterial Phytochrom Cph1 to the agrobacterial Agp1, thereby substantially broadening the experimental basis for a critical evaluation of the primary isomerization reactions in bacterial phytochromes and phytochromes of plants.

Excitation energy and electron transfer dynamics of the core antenna complex of Photosystem I was modeled on the basis of the newly available X-ray structure at 2.5 Å resolution, allowing for predictions of future experiments.

Übersicht über Ergebnisse aus der zweiten Förderperiode, Juli 2001-Juni 2004

Die zweite Förderperiode war einerseits gekennzeichnet durch das Erzielen wichtiger, international beachteter Ergebnisse, vor allem in UP2, andererseits konnte, bedingt durch die im Bewilligungsbescheid ausgesprochene Kürzung der Sach- und Personalmittel (mit Auslauf der C2 Stelle von R. Diller an der FU zum 30. 6. 2002) nur ein reduziertes Arbeitsprogramm (besonders in UP4 und UP1) abgewickelt werden. Verbunden mit dem an der FUB angestrebten Abschluss der Promotion F. Peters zum Ende der laufenden Förderperiode konzentriert sich die Arbeit derzeit ganz auf die erfolgreichen Projekte im UP2 und UP3. Diese werden größtenteils mit der Berufung von R. Diller und nach Abschluss der umfangreichen Aufbauarbeiten für ein neues Kurzzeit-Laserlabor an die TU Kaiserslautern verlagert. Die an der FUB bestehenden experimentellen Möglichkeiten wurden zur erfolgreichen Einrichtung einer Juniorprofessur (J. Zimmermann) genutzt. Die damit verbundene Forschungsplanung wird in einem neuen TP Zimmermann vorgelegt. Das bisherige Teilprojekt B3 läuft aus.

Herausragendes Ergebnis der laufenden Förderperiode waren die Resultate, die in UP2 nach elektronischer Anregung mittels IR-Schwingungsspektroskopie bei Zeitauflösung im sub-Pikosekunden-Zeitbereich (<200 fs) erzielt wurden. Es konnte damit zum ersten Mal die ultraschnelle trans-cis Photoisomerisierung des Retinal-Chromophors in der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (bR) schwingungsspektroskopisch in Echtzeit verfolgt und ihr zeitlicher Ablauf weitaus besser als bisher charakterisiert werden. Damit konnten Fragen geklärt werden, die gerade in den letzten Jahren neu aufgeworfen und in der Literatur heftig

diskutiert wurden. Darüber hinaus wurde die Methode inzwischen auf die lichtgetriebene Chloridionen-Pumpe Halorhodopsin (hR) angewendet und erste Resultate erzielt.

In UP3 wurden die in der ersten Förderperiode an den Isomerisierungsreaktionen des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 durchgeführten kurzzeitspektroskopischen Untersuchungen auf die des Phytochroms des Agrobacteriums Agp1 ausgeweitet. Damit wurde eine breite experimentelle Basis für den Vergleich der Primärreaktionen von pflanzlichen und bakteriellen Phytochromen geschaffen. Die bewährte apparative Zusammenarbeit mit TP A3 (Schwentner) kam hier voll zur Geltung durch die intensive gemeinsame Nutzung von 4 NOPA's, die parallel von einem Ti-Sa CPA – Laser gepumpt werden, und so den simultanen Betrieb von mehreren zeitaufgelösten zwei-Farben-Experimenten erlauben.

In UP4 wurde die seit 2001 verfügbare "Röntgenstruktur" des Kernantennenkomplexes von Photosystem I bei 2.5 Å Auflösung genutzt, um eine strukturgestützte Modellierung der Anregungsenergie- und Ladungstransfer- Dynamik auszuarbeiten. Die experimentellen Arbeiten zur kohärenten Exzitonendynamik konnten mit den personellen Gegebenheiten (wie auch bei Projekten in UP1) nicht in Angriff genommen werden.

Einzelberichte aus der zweiten Förderperiode, Juli 2001-Juni 2004

UP1 und UP2: Trans-cis - Isomerisierung in Bakteriorhodopsin

Ultraschnelle lichtinduzierte Reaktionen in Proteinumgebung, hier die trans-cis Isomerisierung des Retinal-Chromophors in Retinalproteinen, sind von beträchtlichem Interesse, da durch die Proteinumgebung des Reaktanden eine effiziente Prozesssteuerung bzw. Optimierung ausgeübt wird. Ihre Aufklärung rückt durch die parallele Entwicklung von Computersimulationen (Reaktionsdynamik) und experimentellen Methoden (Reaktionsdynamik, Proteinstruktur bei atomarer Auflösung) in größere Nähe. In **UP1** wurde von uns die Strategie verfolgt, durch gezielte Modifikation der Chromophor-Bindungstasche (Einfach- u. Doppelmутanten, Variation von pH und Salzkonzentration) und Femtosekundenzeitaufgelöste optische pump/probe - Experimente den Einfluss der Ladungsverteilung auf die Dynamik der ultraschnellen Primärreaktion bzw. auf die Form der S_1 -Potentialoberfläche des Chromophors qualitativ und durch begleitende Modellrechnungen (TP C2) auch quantitativ beschreiben zu können. Wegen der genannten personellen Einschränkungen konnten diese Projekte in der zweiten Förderperiode noch nicht begonnen werden. Zum Stand wird auf den Bericht über die erste Förderperiode verwiesen.

In diesem Zusammenhang kam der Beschreibung der Reaktion des nativen Systems durch optische pump/probe-Experimente, in Hinblick auf schnelle strukturelle Dynamik aber besonders der ultraschnellen IR-Schwingungs-Absorptionsspektroskopie die vorrangige Bedeutung zu. Dazu sind wir in **UP2** entsprechend unserer Planung vorgegangen und konnten am nativen Bakteriorhodopsin und am bR5.12 sehr gute Erfolge erzielen. Darüber hinaus wurden entsprechende Untersuchungen an Halorhodopsin und Sensorrhodopsin begonnen.

Bakteriorhodopsin (Wildtyp)

Die all-trans zu 13-cis Isomerisierung des Retinal - Chromophors (Abb. 1) im transmembran-

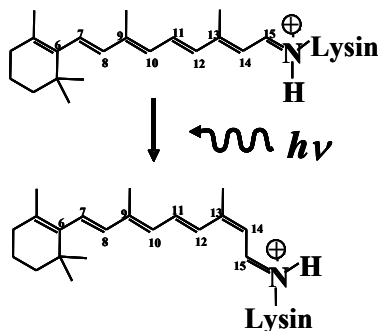


Abb. 1: Schematische Darstellung der all-trans zu 13-cis - Isomerisierung des über eine Schiff-Base an das Protein gebundenen Retinal-Chromophors

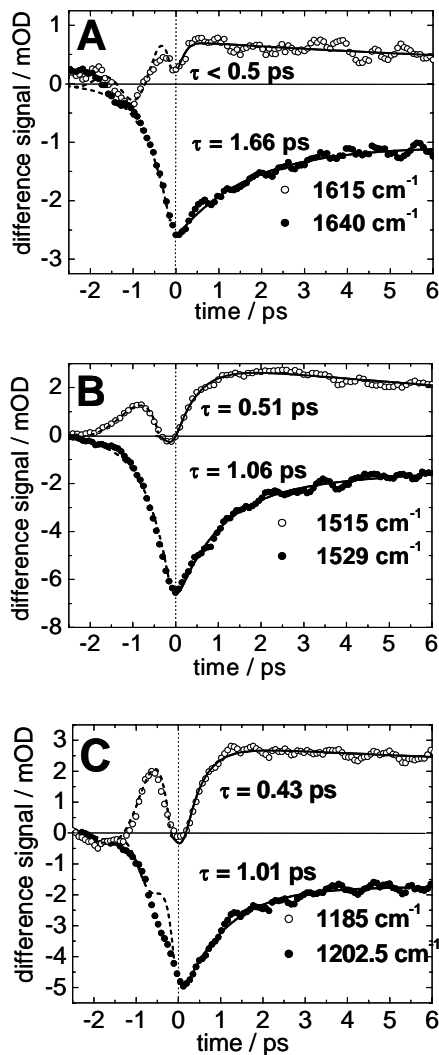


Abb. 2: Ausgewählte IR-Absorptions-Zeitspuren von bR nach Anregung bei 570 nm. Bereiche unterschiedlicher Chromophor Streckschwingungen: C=NH (A), C=C (B) und C-C (C). Die durchgezogene Kurve markiert jeweils den fit der exp. Daten mit einer Summe von Exponentialfunktionen, gefaltet mit der Apparatefunktion. Die Zeitkonstanten geben den Anstieg der pos. Signale bzw. den teilweisen Zerfall der neg. Signale bei pos. Zeiten an. Die durchbrochene Kurve markiert die Simulation des gestörten freien Induktions-Zerfalls zu negativen Zeiten.

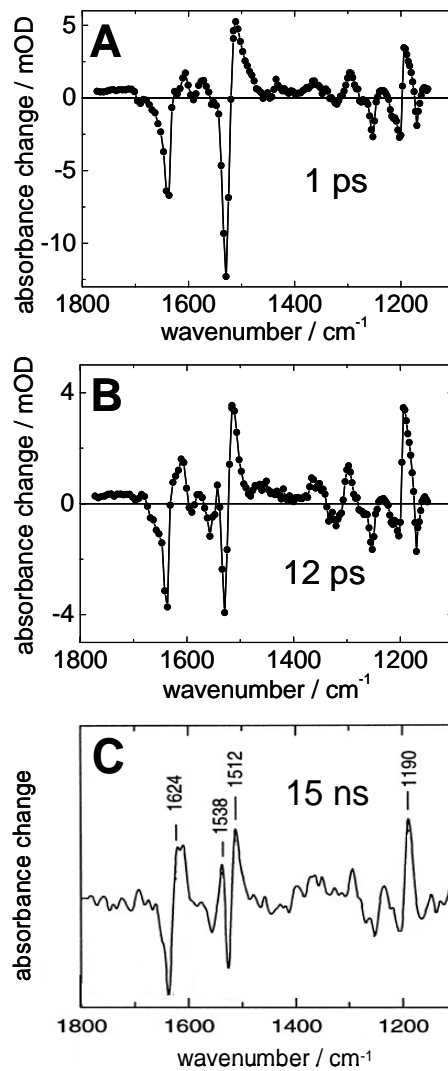


Abb. 3: IR - Differenzspektren von bR 1 bzw. 12 ps nach Anregung bei 570 nm. Zum Vergleich (C) ein FTIR Differenzspektrum nach 15 ns /5/.

Protein Bakteriorhodopsin (bR) wurde erstmals schwingungsspektroskopisch mit einer Zeitaufösung untersucht, die es erlaubt, den Schritt der eigentlichen Isomerisierung anhand von Schwingungs-Markerbanden in Echtzeit zu verfolgen /HHD02a, HHD02b, Her03/. Diese

Experimente schließen eine Lücke in der Literatur, die sich in den letzten Jahren dadurch stark bemerkbar machte, dass das etablierte Modell der Primärreaktion /1, 2, 3/ in Frage gestellt wurde /4/. Ein zentraler Punkt dabei ist der zeitliche Ablauf der Isomerisierung. Laut /1, 2, 3/ erfolgt sie mit dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes S_1 , innerhalb von etwa 500 fs. Aus CARS - Experimenten /4/ wurde dagegen auf eine Zeitkonstante von ca. 3 ps geschlossen (J-K - Übergang).

Zentrale Messkurven unserer Experimente sind in Abb. 2 u. 3 dargestellt. Nach elektronischer Anregung bei 570 nm wurde die transiente IR - Absorption von bR-Probenfilmen zwischen 1800 und 1100 cm^{-1} bestimmt. Abb. 2 zeigt Differenz-Absorptions-Zeitspuren im Bereich wichtiger Chromophor-Schwingungsbanden (C=NH -, C=C - und C-C - Streckschwingung) zusammen mit einer multiexponentiellen Simulation. In Abb. 3 sind Differenz-Übersichtsspektren (1 bzw. 12 ps nach Anregung) und zum Vergleich ein FTIR-Differenzspektrum /5/ nach 12 ns gezeigt. Aus den Daten lässt sich schliessen, dass die 13-cis - Produktbildung mit etwa 500 fs abläuft. Konsistent damit sind sowohl die Beobachtung einer Verschiebung der C=C - Streckschwingungsfrequenz (was auf eine Verschiebung des elektronischen Absorptionsmaximums hindeutet) als auch Änderungen im Bereich der C=NH-Streckschwingung im selben Zeitbereich (Änderung der Umgebung der Schiff-Base-Bindungsstelle an das Protein). Damit konnte klar gezeigt werden, dass die Isomerisierung im Wesentlichen mit 500 fs erfolgt. Anschließend, insbesondere zwischen 0.5 und 3 ps, finden keine substantziellen Strukturveränderungen des Chromophors mehr statt. Allerdings kann für diesen Zeitbereich auf begleitende molekulare Prozesse wie Schwingungsabkühlung und weitere Planarisierung des Chromophors sowie auf Veränderungen der Proteinumgebung geschlossen werden. Daraus ergeben sich Hinweise für die Natur des J-K - Überganges und die Dynamik der entsprechend der Reaktionsquantenausbeute /6/ stattfindenden teilweisen Wiederbesetzung des all-trans - Ausgangszustandes.

Die erzielten Resultate bestätigen und erweitern unsere früheren Ergebnisse /7, 8, 9/ entscheidend durch ihre höhere Zeitauflösung, ihr um mindestens eine Größenordnung besseres Signal/Rausch-Verhältnis und den erweiterten Spektralbereich (fingerprint-Bereich um 1200 cm^{-1} und den Bereich der "H-out-of-plane" - Schwingungen um 850 cm^{-1}).

Bakteriorhodopsin (bR5.12: all-trans - geblockter Chromophor)

Entsprechende Experimente wurden an bR-Proben durchgeführt /DHH03, HHS04/, bei denen der native Retinal-Chromophor durch einen sterisch geblockten Chromophor (s. Abb. 4)

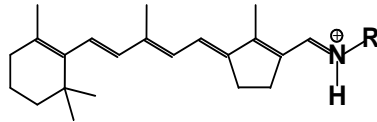


Abb. 4: All-trans geblockter Chromophor

ersetzt wurde (bR5.12). Nach elektronischer Anregung geht bR5.12 mit einer S_1 -Lebensdauer von 16 ps wieder in den Grundzustand zurück. Die Dynamik dieses Systems unterscheidet sich von der des nativen bR nur durch die fehlende Isomerisierung, sodass sich durch den Vergleich Aufschlüsse über die sich im nativen bR stark überlagernden molekularen Prozesse ergeben. So konnten Chromophor-Schwingungsbanden im S_1 -Zustand von bR5.12 nach Lage und Breite charakterisiert werden. Dies dient der Identifizierung entsprechender Schwingungsbanden im nativen bR, die sich dort mit Schwingungsbanden des elektronischen Produkt-Grundzustandes zeitlich überlagern. Weiter wurden im Amid I- und Amid II- Bereich auch nach der Wiederbesetzung des Chromophor - Grundzustandes (45 ps und später) noch IR-Differenzsignale gefunden. Sie zeigen eine zumindest auf dieser Zeitskala (bis 150 ps) irreversible Änderung der Proteinkonformation an, die der kürzere (16 ps!) Reaktionszyklus von bR5.12 induziert. Als molekulare Ursache kommen die mit der elektronischen Anregung verbundene starke Änderung des Chromophor-Dipolmomentes oder aber auch die anfängliche (dann aber gehinderte) Verdrillung des Chromophors in Frage. Sehr ähnliche Differenzbanden wurden auch im nativen bR gefunden. Diese Beobachtungen sind ein wichtiger Hinweis auf eine extrem schnelle Komponente der "Antwort" des Proteins auf die ultraschnellen Primärprozesse sowohl im nativen bR als auch in bR5.12.

Halorhodopsin

Inzwischen wurden ähnliche Experimente an der lichtgetriebenen Cl^- - Pumpe Halorhodopsin (hR) begonnen und erste wichtige Resultate erzielt /PHT04/. Auch hier wird die IR-Spektroskopie benutzt, um den Reaktionsablauf besser zu beschreiben, insbesondere in Hinblick auf die strukturelle Dynamik. Dies ist dadurch möglich, dass die für die unterschiedlichen Chromophor-Konfigurationen charakteristischen Schwingungs-Absorptionsbanden spektral schmalere sind und weitaus weniger Überlapp zeigen als die entsprechenden optischen Absorptionsbanden. Auf diese Weise können Mehrdeutigkeiten in

vorgeschlagenen Reaktionsschemata eingeschränkt, bzw. beseitigt werden. Im Gegensatz zu bR zeichnet sich die Primärreaktion von hR durch einen biexponentiellen S_1 -Zerfall mit 1.5 und 8.5 ps aus /10/. Allerdings konnte die Zuordnung dieser Zeitkonstanten zum reaktiven bzw. nichtreaktiven Weg bisher nicht getroffen werden.

Da die in optischen Messungen beobachteten Zeitkonstanten und ihre relativen Amplituden verhältnismäßig stark von der Salzkonzentration der benutzten Proben-Suspensionen abhängen, waren hier zunächst Experimente nötig, die die Vergleichbarkeit der von uns benutzten hydratisierten hR-Filme mit den in der Literatur beschriebenen wässrigen hR-Suspensionen belegen. Wir haben deshalb optisch/optisch transiente Experimente an hR-Filmen durchgeführt und konnten mit den von uns bestimmten Zeitkonstanten von 1.9 und 7.5 ps die Ergebnisse aus /10/ im Wesentlichen reproduzieren. Im Infraroten zeigen sich ähnliche Zeitkonstanten (1.8 - 2.5 ps und 6.7 - 7.5 ps), jetzt aber mit unterschiedlicher Amplitudenwichtung im Bereich der Grundzustands-Bleichbanden (all-trans Konfiguration) und der Photoproduktbanden (13-cis). Die quantitative Globalanalyse zeigt, dass nun die Kinetik des reaktiven von der des nichtreaktiven Weges unterschieden werden kann. Unsere Daten weisen darauf hin, dass das 13-cis Photoprodukt mit der kurzen Zeitkonstante gebildet wird und die entsprechend der Primärreaktions-Quantenausbeute stattfindende Wiederbesetzung des all-trans - Grundzustandes biphasisch (mit beiden Zeitkonstanten) erfolgt.

Eine weitere wichtige Frage bei hR betrifft die Existenz einer inhomogenen Grundzustandsverteilung (all-trans und 13-cis) wie sie für bestimmte Präparationen von bakteriellen Retinalproteinen beobachtet bzw. vorgeschlagen wird (z. B. für bR mit protonierter Asp85). Es muss klargestellt werden, ob eine beobachtete Biphasizität des S_1 -Zerfalls auf eben eine solche Inhomogenität zurückzuführen ist, oder ob sie eine charakteristische Eigenschaft einer homogenen Spezies ist. Diese Diskussion ist wichtig für alle Arbeiten, die sich mit der Korrelation zwischen der Konstitution der Chromophorbindungstasche, der Konfiguration des Chromophors und seiner Reaktionsdynamik (d. h. der Form seiner S_1 -Potentialhyperfläche) beschäftigen. Unsere Experimente gehen deshalb dahin /DHH02/, spektrale und zeitliche Charakteristika einer ggf. vorliegenden 13-cis - Photoreaktion zu erfassen und sie in die Diskussion um Isomerisierungsreaktionen von all-trans-Retinal in unterschiedlichen Bindungstaschen einzubringen.

Sensorrhodopsin

In Zusammenarbeit mit der Gruppe M. Engelhard (MPI f. Molekulare Physiologie, Dortmund) wurden auch erste vorbereitende Experimente an dem dritten halobakteriellen Retinalprotein Sensorrhodopsin begonnen, die aber noch im Stadium der Probenoptimierung sind und deshalb hier nicht weiter diskutiert werden.

Durch die beschriebenen transienten IR-Experimente ist eine wesentlich verbesserte Beschreibung von ultraschnellen trans-cis - Isomerisierungsreaktionen in Retinalproteinen möglich. Es sind die bisher einzigen Experimente, in denen die strukturelle Dynamik der Primärreaktion, insbesondere die Isomerisierung selbst, schwingungsspektroskopisch mit hinreichender spektraler und zeitlicher Auflösung untersucht wurde. Die breit angelegte Untersuchung verwandter Retinalproteine mit ähnlichen aber klar unterschiedlichen Primärreaktionen ist notwendig, um zu einem einheitlichen Bild von Isomerisierungsreaktionen in einer stark katalytischen Proteinumgebung zu gelangen. Die Projekte aus **UP1** und **UP2** werden im Rahmen der Berufung von Herrn Diller an die TU Kaiserslautern dorthin transferiert.

UP3: Isomerisierung in cyanobakteriellem Phytochrom

Phytochrome sind Photorezeptoren, die in Pflanzen wichtige Schritte der Photomorphogenese initiieren und kontrollieren. Der Bilin-Chromophor (Beispiel in Abb. 5) liegt in Phytochromen in zwei funktionell wichtigen Konfigurationen vor. Photoisomerisierung um eine C-C-Doppelbindung (Umorientierung des endständigen Pyrrolringes D) und nachfolgende thermische Reaktionsschritte überführen die Pr-Form (red absorbing) in die Pfr-Form (far-red absorbing) und umgekehrt. Durch die Existenz zweier unterschiedlicher Isomerisierungsreaktionen in ein und derselben Bindungstasche sind Phytochrome interessante Kandidaten für das Studium von Protein-gestützten bzw. -gesteuerten Photoreaktionen. Die Entdeckung von bakteriellen Phytochromen eröffnete völlig neue Perspektiven in der Phytochromforschung in Hinblick auf deren Funktion als Photorezeptor bzw. den Mechanismus der Photoreaktion in pro- und eukariotischen Systemen und die Kristallisierbarkeit des Proteins für Röntgen - Strukturaufklärung. In der ersten Förderperiode (s. Bericht) konnten wir erstmals die lichtinduzierten Primärreaktionen eines bakteriellen Phytochroms, Cph1 von Cyanobacterium *Synechocystis*, untersuchen /HHS02, Hey01/. Diese Arbeiten wurden in der laufenden Förderperiode (Gastaufenthalt Prof. I. Y. Chan, Brandeis Univ.) erfreulicherweise auf ein zweites bakterielles Phytochrom, Agp1 von *Agrobacterium tumefaciens*, ausgeweitet /CPH04/. Die optischen und Bindungseigenschaften von Agp1 sind in der Literatur beschrieben /11, 12/. Unsere Resultate schaffen eine breite Basis für den Vergleich der Photoisomerisierungsreaktionen in unterschiedlichen Phytochromen. Interessante Aspekte dabei sind der Einfluss der Bindung zwischen Chromophor und Protein (kovalent oder nicht kovalent) auf die Kinetik der Primärreaktion, sowie ihre Beschreibung durch eine Verteilung von Reaktionsraten oder aber durch ein sequentielles Ratenmodell.

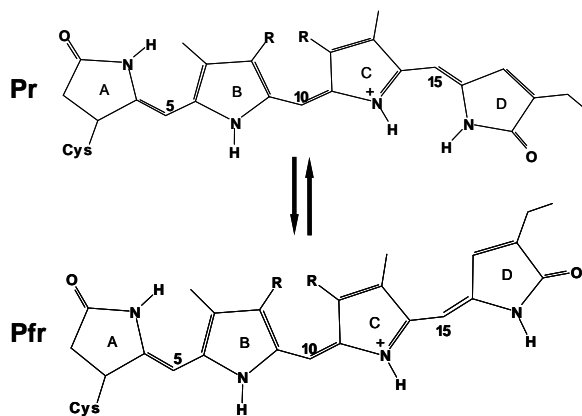


Abb. 5: Beispiel eines Bilin-Chromophors (Phycocyanobilin) in seinen zwei funktionell wichtigen Konfigurationen.

Ergebnisse an Phytochrom Agp1 von *Agrobacterium tumefaciens*

Transiente Absorptions-Experimente mit 150 fs Zeitauflösung (FWHM der Kreuzkorrelation zwischen optischem Anregungs- und optischem Abtast-Puls) wurden an der Pr- und der Pfr-Form des Biliverdin- und des Phycocyanobilin-Addukts von Agp1 (BV-Agp1 und PCB-Agp1) sowie der Cys20Ala-Mutante (BV-Agp1/C20A) des BV-Addukts durchgeführt (Tabelle 1). Abb. 6 zeigt am Beispiel des BV-Adduktes die Absorptionsspektren der Pr- und der Pfr-Form.

System	λ_{\max}/nm	$\lambda_{\text{exc}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{probe}}/\text{nm}$
BV-Agp1-Pr	701	680	620 - 760
BV-Agp1-Pfr	ca. 750	765	590 - 760
BV-C20A/Agp1-Pr	700	680	620 - 760
BV-C20A/Agp1-Pfr	ca. 745	765	680 und 730
PCB-Agp1-Pr	686	660	618 - 745
PCB-Agp1-Pfr	ca. 733	750	590 - 760

Tabelle 1: Liste der untersuchten Systeme mit entsprechenden Absorptionsmaxima (λ_{\max}), Anregungswellenlängen (λ_{exc}) und den jeweils abgetasteten Spektralbereichen (λ_{probe}).

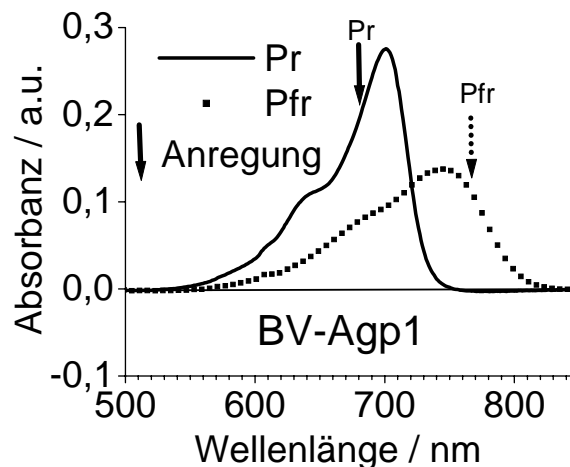


Abb. 6: Statische Absorptionsspektren der Pr- und Pfr-Form des BV-Adduktes von Agp1 mit den entsprechend benutzten Anregungswellenlängen.

Cys20 ist die kovalente Bindungsstelle zwischen dem nativen Chromophor BV und dem Protein. In der C20A - Mutante ist BV, im Wildtyp PCB nicht mehr kovalent an das Protein gebunden. Trotzdem bilden beide Addukte jeweils ein Holoprotein mit den für Phytochrome charakteristischen photochromen Eigenschaften.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Aufgeführt sind die Zeitkonstanten als Ergebnis von Simulationen bzw. von fits der Absorptions-Zeitspuren in den in Tabelle 1 genannten Bereichen gemäß

$$\Delta A(t, \lambda_{pr}) = A_0(\lambda_{pr}) + \sum_1^N A_i(\lambda_{pr}) * e^{-t/\tau_i} \quad (1)$$

Ein erster Vergleich mit den zuvor erzielten Ergebnissen am cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 zeigt, dass wesentliche dynamische Eigenschaften in den Primärreaktionen der unterschiedlichen Agp1-Systeme wieder zu finden sind.

	Pr		Pfr	
	τ_1/ps	τ_2/ps	τ_1/ps	τ_2/ps
BV-Agp1	5(1)	85(1)	0.46(5)	2.9(1)
BV-C20A/Agp1	5.5(1)	23(3) ¹ (33@620 nm, 15@760 nm) ²	0.23(2)	1.75(50)
PCB-Agp1	6.6(2)	126(1)	0.63(1)	3.2(1)
PCB-Cph1	$\lambda_{exc} = 650\text{nm}$: 12(8-15) ³ 15.7 ⁴	48(32-88) ³	0.54(2)	3.2(4)
	$\lambda_{exc} = 615\text{nm}$: 15(5-22) ³ 19.6 ⁴	97(35-300) ³		

¹gewichtetes Mittel aus fits von 13 Zeitspuren bei individuellen Abtast-Wellenlängen.

²Werte aus linearem fit von 13 Zeitkonstanten (aus Zeitspuren zwischen 620 und 760 nm, s. ¹).

³biexponentieller fit (Wahrscheinlichkeitsintervall 95%)

⁴erstes Moment einer Verteilung von Zeitkonstanten, gewonnen aus globalem fit.

Tabelle 2: Zusammenfassung der kurzzeitspektroskopischen Experimente an Phytochrom von *Agrobacterium tumefaciens*. Die Zeitkonstanten entsprechend Gl. 1 sind gegeben als gewichtetes Mittel (Fehler) aus den fit-Ergebnissen bei den individuellen Abtast-Wellenlängen. Dem Vergleich dienen entsprechende Ergebnisse an Phytochrom (PCB-Cph1) von *Cyanobacterium Synechocystis /HHS02/*.

Für jede Pr- bzw. Pfr-Form sind zur Simulation des Reaktionsablaufes gemäß (1) zwei Zeitkonstanten nötig. Durch sie wird, abgesehen von Vorgängen auf einer Zeitskala von 100fs (schnelle Dynamik beim Verlassen der Franck-Condon-Region), der Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes und der stimulierten Emission sowie die Wiederbesetzung des

elektronischen Grundzustandes auf der Edukt- und der Produktseite hinreichend gut beschrieben. Die Pr-Reaktionen laufen dabei auf einer Zeitskala von 5 - 100 ps ab, also deutlich langsamer als die Pfr-Reaktionen mit einem Bereich von 0.2 - 3 ps. Damit sind im Prinzip die von uns in /HHS02/ für Cph1 aufgeführten und diskutierten Reaktionsmodelle auch auf Agp1 anwendbar. D. h. für Pr eine Reaktion mit einer Barriere auf der S_1 -Oberfläche, für Pfr eine weitaus schnellere Reaktion entlang eines barriereelos verlaufenden Weges auf der S_1 -Oberfläche. Allerdings zeigen sich bei den Agp1-Systemen einige Besonderheiten:

1. Die grobe Einteilung der Pr und der Pfr-Reaktion in "langsam" und "schnell" mit jeweils sehr ähnlichen Zeitkonstanten zeigt sich gleichermaßen bei kovalent (BV-Agp1, PCB-Cph1) und nicht-kovalent (BV-C20A/Agp1, PCB-Agp1) gebundenen Chromophoren. Dies beweist, dass zur Etablierung der Photoreaktionen und der funktionell wichtigen Photochromizität die kovalente Bindung in erster Linie nicht nötig ist, sondern andere, nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein diese Funktion erfüllen. Da die Röntgen-Struktur von Phytochrom noch nicht bekannt ist, lassen sich genauere Aussagen über die Konstituenten dieser Bindung und ihrer Auswirkung auf die Primärreaktionen zur Zeit nur schwer treffen.

2. Bei der Pr-Reaktion von BV-C20A/Agp1 zeigt sich überraschenderweise eine Wellenlängenabhängigkeit der Zeitkonstante τ_2 , die im Wellenlängenbereich von 620 bis 760 nm zwischen 33 und 15 ps (linearer fit) variiert (Abb. 7). Bemerkenswert ist sowohl die

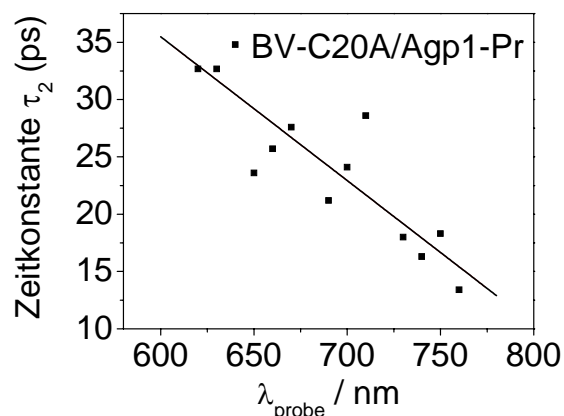


Abb. 7: Wellenlängenabhängigkeit von τ_2 in der Pr-Reaktion von BV-C20A/Agp1. Gezeigt sind die Ergebnisse von biexponentiellen fits der experimentellen Zeitspuren und ein linearer fit der daraus ermittelten Zeitkonstanten τ_2 .

Wellenlängenabhängigkeit als auch der wesentlich kleinere Wert von τ_2 im Vergleich zu den τ_2 -Werten der anderen Systeme. Diese Beobachtung ist unter den bearbeiteten Phytochromsystemen einzigartig und konnte noch nicht eindeutig erklärt werden. In Frage käme z. B. eine inhomogene Verteilung von Proteinkonformationen, die sich auf die Barrierenhöhe und damit auf die entsprechende Geschwindigkeitskonstante auswirkt.

3. In /HHS02/ wurde zur Analyse der Pr-Reaktion sowohl eine biexponentielle Funktion (entsprechend Gl. 1) als auch eine Verteilung von Ratenkonstanten alternativ verwendet. Die Bedeutung der verschiedenen fit-Modelle liegt in der Anzahl tatsächlicher physikalisch vorliegender Reaktionsschritte. Haben wir in /HHS02/ für PCB-Cph1-Pr noch der Ratenverteilung Vorrang gegenüber einer biexponentiellen fit-Funktion gegeben, sind bei BV-C20A/Agp1-Pr Hinweise für eine tatsächlich in zwei Schritten ablaufende Reaktion erkennbar.

Die beschriebenen Kurzzeitexperimente an cyano- und agrobakteriellem Phytochrom finden hiermit einen ersten Abschluss. Es zeichnet sich ab, dass wie bei den Retinalproteinen die Primärreaktionen in den unterschiedlichen aber verwandten Systemen ähnlich, aber nicht gleich ablaufen. Dies kommt durch die zwar in den gleichen Bereichen liegenden, aber doch signifikant unterschiedlichen Zeitkonstanten der jeweiligen Pr- bzw. Pfr-Reaktionen zum Ausdruck (s. Tabelle 2). Unterschiede zu Retinal-Systemen liegen beim Phytochrom in der Existenz zweier, sehr verschieden schneller und reversibler Isomerisierungsreaktionen in der selben Bindungstasche und in der sehr viel kleineren Reaktionsquantenausbeute. Die Natur der Barriere im Pr-Reaktionsweg ist noch unklar wie auch die Auswirkung der Protein-Chromophor - Wechselwirkung auf die beiden Primärreaktionen. Einige Aspekte dieser Fragen werden durch weitere kurzzeitspektroskopische Untersuchungen auch ohne die zur Zeit noch ausstehende Struktur von Phytochrom beantwortbar sein.

UP4: Kohärente Exzitationendynamik im Kernantennenkomplex von Photosystem I

Das hier untersuchte Photosystem(PS) I besteht aus einem Kernantennenkomplex (mit 90 Chlorophyllen (Chl) und weiteren Kofaktoren) mit sehr effizienten Licht-Sammel - und Transfer - Eigenschaften zum Reaktionszentrum, wo Lichtenergie in Ladungstrennung umgewandelt wird. Mit dem 2001 erfolgten Durchbruch /13/ einer PS I Struktur bei 2.5 Å Auflösung (PDB Kennzeichen 1JB0) wurde eine strukturbasierte Modellierung der für das

gleiche PS I Material selbst erzielten und in der Literatur berichteten Ergebnisse der stationären und transienten optischen Spektroskopie ausgearbeitet /BJK02/. Dabei konnte der Einfluss folgender Parameter auf die Anregungsenergieodynamik untersucht werden: Orientierungsfaktor, Zuordnung von Energien der einzelnen Antennen Chl-Bindungsplätze, Umverteilung von Oszillatorstärke, Energieaufspaltung, Orientierung von Übergangsdipolen u.a. aufgrund der exzitonischen Kopplung sowie die Rolle von speziellen Chl-Clustern und speziellen Anordnungen zum Reaktionszentrum. Die Ergebnisse, ebenso wie inzwischen weitere in der Literatur vorgelegte Modellierungen, vermögen sehr gut die hohe Effizienz und Robustheit (gegenüber natürlichen wie durch gezielte Mutagenese erzeugten Systemunterschieden) der Anregungsenergieodynamik in PS I zu erklären. Es ist offensichtlich, dass die beobachtete Dynamik weder durch den Anregungsenergieübertrag zum Reaktionszentrum noch durch den primären Ladungstrennungsschritt im Reaktionszentrum limitiert, vielmehr ausbalanciert ist. Wichtig ist schließlich, daß damit konkrete Voraussagen zu geplanten Experimenten mit modifizierten Antennenkomplexen und mit über die Anregungswellenlänge selektierten Einzelprozessen, besonders solchen mit kohärenter Exzitonendynamik, gemacht werden können.

Literatur

- /1/ J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser und D. Oesterhelt, Chem. Phys. Lett. 144 215-220 (1988)
- /2/ R. Mathies, B. Cruz, W. Pollard und C. Shank, Science 240 777-779 (1988)
- /3/ W. Zinth W, A. O. Sieg, P. Huppmann, T. Blankenhorn, D. Oesterhelt und M. Nonella, Ultrafast Phenomena XII, Springer Series in Chem. Phys. 66, eds. Elsaesser T., Mukamel S., Murnane M. M., Scherer N. F., pp. 680-682 (2000)
- /4/ G. H. Atkinson, L. Ujj und Y. Zhou, J. Phys. Chem. A 104 4130-4139 (2000)
- /5/ C. Rödig, I. Chizhov, O. Weidlich und F. Siebert F, Biophys. J. 76 2687-2701 (1999)
- /6/ G. Schneider, R. Diller und M. Stockburger, Chem. Phys. 131 17-29 (1989)
- /7/ R. Diller, S. Maiti, G. C. Walker, B. R. Cowen, R. Pippenger, R. A. Bogomolni und R. M. Hochstrasser, Chem. Phys. Lett. 241 109-115 (1995)
- /8/ R. Dziewior und R. Diller, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 100 2103-2106 (1996)
- /9/ R. Diller, Chem. Phys. Lett. 295 47-55 (1998)

- /10/ T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts und D. Oesterhelt,
Chem. Phys. Lett. 241 559-565 (1995)
- /11/ T. Lamparter, N. Michael, F. Mittmann und B. Esteban,
PNAS 99 11628-11633 (2002)
- /12/ T. Lamparter, N. Michael, O. Caspani, T. Miyata, K. Shirai und K. Inomata,
J. Biol. Chem. 36 33786-33792 (2003)
- /13/ P. Jordan, P. Fromme, H.T. Witt, O. Klukas, W. Saenger und N. Krauß,
Nature 411 909-917 (2001)

Publikationen im Teilprojekt

- /Hey01/ K. Heyne, Ultraschnelle Dynamik Protein-gesteuerter Reaktionen in Bakteriorhodopsin und bakteriellem Phytochrom. Dissertation, Freie Universität Berlin (2001)
- /HHS02/ K. Heyne, J. Herbst, D. Stehlik, R. Diller, B. Esteban, T. Lamparter und J. Hughes, Ultrafast Dynamics of Phytochrome from Cyanobacterium *Synechocystis*, reconstituted with Phycocyanobilin (Cphl-PCB) and Phycoerythrobilin (Cphl-PEB). *Biophys. J.* 82 (2) 1004-1016 (2002)
- /BJK02/ M. Byrdin, P. Jordan, N. Krauß, P. Fromme, D. Stehlik und E. Schlodder, Light Harvesting in Photosystem I – Modeling based on the 2.5 Å structure of Photosystem I from *Synechococcus elongates*. *Biophys. J.* 83 (1) 433-457 (2002)
- /HHD02a/ J. Herbst, K. Heyne und R. Diller, Femtosecond Infrared Spectroscopy of Bacteriorhodopsin Chromophore Isomerization. *Science* 297 822-825 (2002)
- /HHD02b/ J. Herbst, K. Heyne und R. Diller, Primary Processes in the Photoisomerization of Bacteriorhodopsin studied by Femtosecond Infrared Spectroscopy. *Femtochemistry and Femtobiology*, (A. Douhal and J. Santamaria, eds.) pp. 764-770 World Scientific (2002)
- /DHH02/ R. Diller, K. Heyne, J. Herbst und U. Alexiev, The first steps of the perturbed photoreaction of bacteriorhodopsin in the blue form, studied by fs time resolved IR-spectroscopy. 46th Ann. Meeting of the Biophys. Society, *Biophys. J.* 82, a: 1105, b:1098 (2002).
- /DHH03/ R. Diller, J. Herbst, K. Heyne, M. Ottolenghi, N. Friedman und M. Sheves, Vibrational Dynamics upon photoexcitation of native bacteriorhodopsin (bR) and of the all-trans - locked bR5.12. *Ultrafast Phenomena XIII* (eds. R. J. D. Miller, M. M. Murnane, N. F. Scherer, A. M. Weiner) pp. 640-642 Springer Series in Chemical Physics, Berlin (2003)

- /Her03/ J. Herbst, Charakterisierung der Photoisomerisierung in Bakteriorhodopsin durch Femtosekunden-Infrarot-Spektroskopie. Dissertation, Freie Universität Berlin (2003)
- /HHS04/ J. Herbst, K. Heyne, M. Sheves, M. Ottolenghi, N. Friedman und R. Diller, Photoinduced Response of all-trans - locked Retinal reconstituted Bakteriorhodopsin, studied by Ultrafast Infrared Vibrational Spectroscopy. In Vorbereitung.
- /CPH04/ I. Y. Chan, F. Peters, J. Herbst, D. Stehlik, B. Esteban, T. Lamparter und R. Diller, Primary Reaction Dynamics of Phytochrome from Agrobacterium tumefaciens. In Vorbereitung.
- /PHT04/ F. Peters, J. Herbst, J. Tittor, D. Oesterhelt und R. Diller, Primary Reaction Dynamics of Halorhodopsin, observed by Ultrafast IR - Vibrational Spectroscopy. In Vorbereitung.

Mitarbeiter Prof. Dr. D. Stehlik, Prof. Dr. R. Diller, Dipl. Phys. K. Heyne (bis 30. 6. 2001), Dipl. Phys. J. Herbst (bis 31. 1. 2003), Dipl. Phys. F. Peters (1. 4. 2002 - 30. 6. 2004)

Promotionen

- Heyne, Karsten "Ultraschnelle Dynamik Protein-gesteuerter Reaktionen in Bakteriorhodopsin und bakteriellem Phytochrom"
Dissertation, Freie Universität Berlin (2001)
- Herbst, Johannes "Charakterisierung der Photoisomerisierung in Bakteriorhodopsin durch Femtosekunden-Infrarot-Spektroskopie"
Dissertation, Freie Universität Berlin (2003)

Kooperationen (außerhalb des Sfb)

Die beschriebenen Projekte werden im Rahmen der folgenden Kooperationen durchgeführt, die uns biologisch gut charakterisierte Materialien sichern und den wissenschaftlichen Austausch substanziell erweitern.

- Bakteriorhodopsin: Prof. D. Oesterhelt, Dr. J. Tittor (MPI f. Biochemie, Martinsried),
Prof. M. Sheves (Weizmann Institut), Prof. M. Ottolenghi (Hebrew
University),
Prof. M. Heyn, Dr. U. Alexiev (FU Berlin)
Insbesondere die Zusammenarbeit mit Prof. Sheves ermöglicht uns die
zeitaufgelösten IR-Experimente an Bakteriorhodopsin mit
"geblocktem" Chromophor.
- Halorhodopsin: Prof. D. Oesterhelt, Dr. J. Tittor (MPI f. Biochemie, Martinsried)
- Sensorrhodopsin: PD Dr. M. Engelhard (MPI f. Molekulare Physiologie, Dortmund)
- Phytochrom: Dr. T. Lamparter (FU Berlin)
- Photosystem I: PD Dr. E. Schlodder (TU Berlin), Dr. N. Krauß (HU Berlin), Prof. Dr.
P. Fromme (Arizona State Univ. USA, TU Berlin)