

701 – Zeitaufgelöste Fouriertransformierte-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) an Bakteriorhodopsin

Versuchsprotokoll zum F-Praktikum an der Ruhr-Universität Bochum

Paul Katolla <p_katolla@yahoo.de>

15.01.2010

Tobias Krähling <Tobias.Kraehling@SemiByte.de>

Version 1.1

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	
2 Grundlagen	
2.1 Biochemische Grundlagen	
2.1.1 Proteine	
2.1.2 Schiff'sche Base	
2.1.3 Retinal	
2.1.4 Bakteriorhodopsin	
2.2 IR-Spektroskopie	
2.2.1 IR- versus FTIR-Spektroskopie . .	
3 Durchführung der Messung	
3.1 Beurteilung der Probenqualität	
3.2 Licht-Dunkel-Differenzspektrum	
3.3 Fast-Scan-Messung	
4 Fazit	
Anhang: Tabellen und Spektren	
Literatur	

1 Einführung

1 An Bakteriorhodopsin (im Folgenden mit bR abgekürzt), einem Cytoplasmamembranprotein des Halobakteriums *Halobacterium salinarium*, wird seit Jahren intensiv geforscht und konnte als erstes Membranprotein strukturaufgeklärt werden. Als verhältnismäßig einfaches Membranprotein besitzt es in der biochemischen und biophysikalischen Forschung Modellcharakter, ähnlich dem Wasserstoffatom in der Atomphysik und Quantenmechanik. In diesem Versuch soll mittels FTIR-Spektroskopie, einem etablierten und breit angewendeten Analyseverfahren, das bR näher untersucht werden. Da das bR Protonen vom Cytoplasma zum Extramedium transportiert, eine sogenannte Protonenpumpe, stellt dieses Protein die Energiequelle für die ATP-Synthese dar. Mit Hilfe der FTIR soll im Rahmen dieses Versuches die Protonenpumpe untersucht und der Weg des Protons nachvollzogen werden.

2 Grundlagen

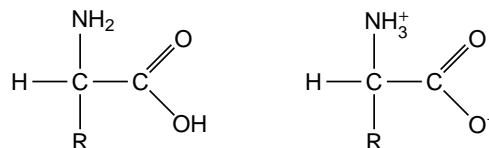
2.1 Biochemische Grundlagen

2.1.1 Proteine

Proteine, auch als einfache Eiweiße bezeichnet, sind Makromoleküle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind und gehören zu den Grundbausteinen aller biologischen Zellen. Abhängig von der Sequenz der Aminosäuren, d. h. der Abfolge der einzelnen Aminosäuren in der Kette, besitzen die Proteine unterschiedlichste Eigenschaften, wie beispielsweise die Fähigkeit, Stoffe zu transportieren oder Ionen zu pumpen, und bestimmen die Zellstruktur.

Basis der Proteine sind die α -Aminosäuren, die aus dem zentralen C-Atom, einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$), eine Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), einem Wasserstoff sowie einem Aminosäurerest (Seitenkette oder kurz Rest R) bestehen (siehe Abbildung 1(a)). Mit Ausnahme der einfachsten Aminosäure, dem Glycin, sind alle natürlichen Aminosäuren asymmetrisch um das zentrale α -Kohlenstoffatom gebunden – d. h. die Aminosäuren haben eine Stereoisomerie/Chiralität und die beiden Enantiomere¹ sind optisch aktiv und drehen die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht um den selben Betrag, jedoch zu entgegengesetzten Richtungen. Üblicherweise werden die beiden Enantiomere mit (+) für rechtsdrehend und (–) für linksdrehend gekennzeichnet. FISCHER hatte zur Bezeichnung von konfigurationsisomeren Monosacchariden das D,L-System eingeführt, die auch in anderen Bereichen eingesetzt wird. Eine D-Konfiguration liegt vor, wenn die Hydroxylgruppe des Enantiomers bei der Fischer-Projektion sich auf der rechten

¹ Stereoisomere eines chiralen Moleküls, die sich wie Objekt und Spiegelbild verhalten, werden als Enantiomere bezeichnet.



(a) nichtionisierte Form (b) Zwitterionenform

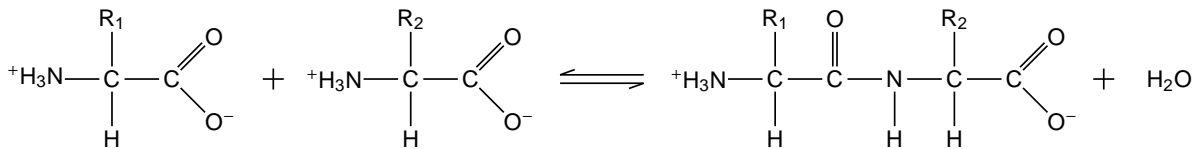
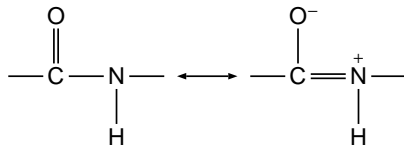
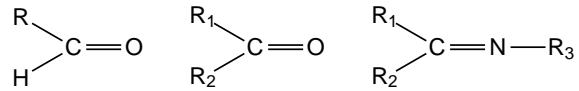
Abbildung 1: Struktur der nichtionisierten und der Zwitterionenform einer Aminosäure

Seite des Verbindungsstamms befindet, entsprechend eine L-Konfiguration, wenn sich die Hydroxylgruppe auf der linken Seite befindet² (Hauptmann, 1992). Alle α -Aminosäuren, aus denen Proteine aufgebaut sind, haben L-Konfiguration und werden auch als *proteinogene Aminosäuren* bezeichnet – dabei erfolgt der Proteinaufbau nur durch 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren. Die Aminosäuren liegen in Feststoffen und neutraler, wässriger Lösung als sogenannte *Zwitterionen* vor, d. h. die Aminogruppe ist protoniert ($-\text{NH}_3^+$) und die Carboxylgruppe deprotoniert ($-\text{COO}^-$), siehe Abbildung 1(b).

Verbinden sich zwei oder mehrere Aminosäuren, so entsteht zunächst ein Peptid oder auch Polypeptid unter Abspaltung von Wasser (Kondensation, intermolekulare Dehydratisierung, siehe Abbildung 2). Das Strukturmerkmal der Peptide ist die Peptidbindung, die planar ist, da die C – N-Bindung partiellen Doppelbindungscharakter hat (*Mesomerie* oder *Resonanz*, siehe Abbildung 3). Die sich so bildenden Aminosäureketten werden bis zu einer Länge von ca. 100 Aminosäuren als Peptide, bei größeren Ketten als Proteine bezeichnet – das mit ca. 3600 kDa³ größte bekannte menschliche Protein *Titin* besteht aus über 30.000 Aminosäuren (Wikipedia, 2009). Diese Polypeptidketten haben durch die un-

² Diese Seitenbezeichnung hat jedoch nichts mit der Drehrichtung des linear polarisierten Lichts zu tun.

³ Ein Dalton (1 Da) ist gleich der atomaren Masseneinheit *u*.

**Abbildung 2:** Entstehung der Peptidbindung**Abbildung 3:** Mesomerie der Peptidbindung**Abbildung 4:** Struktur von Aldehyd (links), Keton (mittig) und Azomethin (rechts)

terschiedlichen Enden (Amino- und Carboxylgruppe) ein festgelegte Richtung. Für die Bezeichnung wird an der Aminogruppe begonnen und die Sequenz der einzelnen Aminosäuren bis zur Carboxylgruppe notiert. Als Hauptkette oder Rückgrat wird die Kette der sich regelmäßig wiederholende Einheiten bezeichnet, an der sich die variablen Seitenketten der einzelnen Aminosäuren befinden. Je nach Eigenschaften der Seitenketten kann es zu verschiedenen Faltungen des Polypeptids kommen, z. B. die α -Helix, bei der die eng aufgewickelte Hauptkette ein Stabinneres bildet und die Seitenketten schraubenartig nach außen weisen oder das β -Faltblatt, die mehr eine plattenförmige Gestalt besitzt und bei der die Polypeptidkette fast völlig gestreckt vorliegt. Innerhalb eines Proteins können sich diese Strukturen abwechseln und über eine β -Schleife auch ihre Richtung umkehren. Diese räumliche Struktur legt dann die möglichen Eigenschwingungen des Proteins fest.

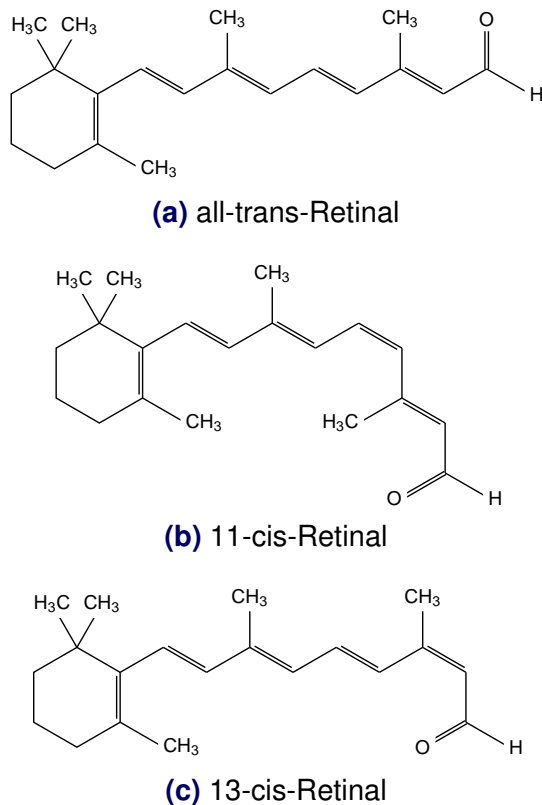
2.1.2 Schiff'sche Base

Werden in Aldehyden oder Ketonen das Sauerstoffatom durch ein Stickstoffatom ersetzt, so wird diese Verbindungsklasse als *Imine* bezeichnet. Trägt das Stickstoffatom statt dem Wasserstoffatom einen anderen zusätzlichen

organischen Rest, so wird dies als *Azomethin* oder *Schiff'sche Base* bezeichnet (siehe Abbildung 4).

2.1.3 Retinal

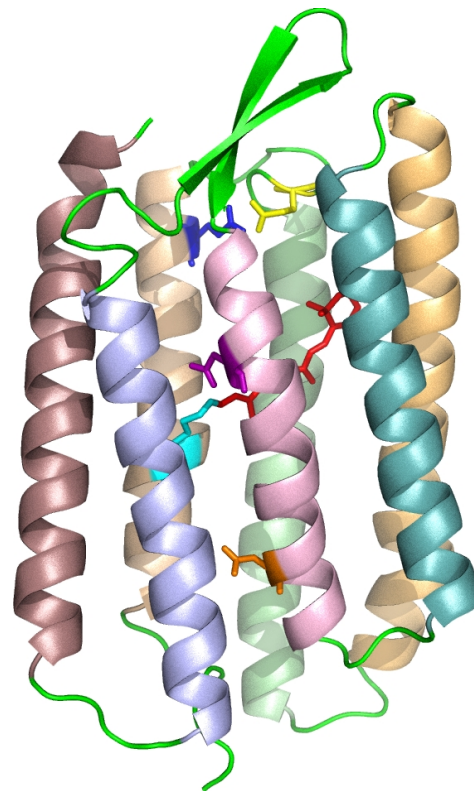
Das Aldehyd des Retinols (Vitamin A₁) wird als Retinal bezeichnet und gehört zu der Gruppe der Carotinoiden und somit zur großen Gruppe der Terpene. Retinal ist dabei unpolar und chromophor, absorbiert also Licht. Wird ein Lichtquant absorbiert, so findet eine Isomerisierung des Retinals statt. Beispielsweise ist in den Stäbchen der menschlichen Netzhaut das Protein Rhodopsin enthalten, das aus einem Proteinanteil (dem sogenannten Opsin) und dem Isomer 11-cis-Retinal aufgebaut ist. Absorption eines Lichtquants führt zu einer Konfigurationsänderung von der 11-cis-Form zur all-trans-Form. Dieses Isomer kann aber die Bindung zum Opsin nicht aufrechterhalten – die Strukturänderung führt zu einem elektrischen Impuls, der vom Gehirn als Lichteindruck registriert wird. Durch enzymatische Umwandlung wird die all-trans-Form wieder in die 11-cis-Form umgewandelt und kann die Bindung zum Opsin wieder herstellen (Hauptmann, 1992; Raven und Johnson, 2001). Bei dem hier zu untersuchenden bR findet die

**Abbildung 5:** Isomere des Retinals

Konfigurationsänderung nicht zu der 11-cis-Form, sondern zu der 13-cis-Form statt (siehe Abbildung 5).

2.1.4 Bakteriorhodopsin

bR (siehe Abbildung 6) ist ein integrales Cytoplasmamembranprotein des Halobakteriums *Halobacterium salinarium*, ein einzelliger Mikroorganismus, der extrem salzhaltige Umgebungen bevorzugt (sogenannte extreme Halophile). Dabei fungiert das bR, das zu den retinalbindenden Proteinen gehört, bei Lichtabsorption als Protonenpumpe, wobei Protonen aus dem Cytoplasma in das Extramedium überführt werden und der so entstehende Protonengradient zur Energiegewinnung für die ATP-Synthase führt. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich wird besteht bR aus sieben Helices, die die Cytoplasmamembran durchspannen,

**Abbildung 6:** Bakteriorhodopsin

Besonders hervorgehoben sind Retinal (rot), Lysin 216 (cyan), Aspartat 85 (lila), Aspartat 96 (orange), Glutamat 194 (gelb) und Glutamat 204 (blau). Das bR ist in der Abbildung derart ausgerichtet, das sich oben das extrazelluläre Medium und unten das Cytoplasma befindet. Erstellt aus PDB-Datensatz mit PDB-ID: 1QHJ (DOI: [10.2210/pdb1qhj/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1qhj/pdb))

wobei jeweils drei bR sich zu untereinander dichtgepackten und hexagonal angeordneten Trimeren organisieren (siehe Abbildung 7). Jedes bR besteht aus 248 Residuen (26,8 kD) und das Retinal (rot in Abbildung 6) ist über eine Schiff'sche Base kovalent an das Lysin 216 (cyan in Abbildung 6) gebunden. Aufgrund der Trimerorganisation konnte bei bR als erstes Membranprotein die Struktur aufgeklärt werden und ist Gegenstand intensiver Forschung. (Kandt, 2003)

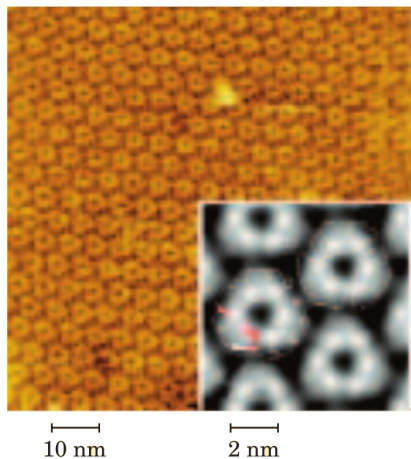


Abbildung 7: AFM-Aufnahme von Bakteriorhodopsin. Deutlich zu erkennen ist die hochreguläre Struktur, in die sich die Bakteriorhodopsin-Trimere organisieren (Nelson und Cox, 2004).

Photozyklus

Das Retinal (siehe Abschnitt 2.1.3) besitzt ein Absorptionsmaximum im nahen Ultraviolett bei 370 nm und das Opsin im fernen UV bei 280 nm⁴. Jedoch wird durch die kovalente Bindung des Retinals an das Protein über eine Schiff'sche Base das Absorptionsmaximum des Retinals zu höheren Wellenlängen in den optischen Spektralbereich verschoben und das bR erscheint purpurrot (Absorptionsmaximum bei ~ 560 nm).

Im dunkeladaptierten Zustand liegt das Retinal zu gleichen Teilen in der all-trans- und der 13-cis-Form vor (Absorptionsmaximum des bR bei $\lambda_{max}^{BR} = 548$ nm), während im lichtadaptierten Grundzustand nur die all-trans-Form vorliegt ($\lambda_{max}^{BR} = 568$ nm). Wird im lichtadaptierten Grundzustand ein Photon absorbiert, so startet der Photozyklus, indem das Retinal von der all-trans-Form in die 13-cis-Form übergeht (J-Intermediat). Diese Konfor-

⁴ Proteine haben im Allgemeinen ihr Absorptionsmaximum im UV-Bereich, ihre Farbe erhalten sie nur durch chromophore Gruppen.

mationsänderung wirkt sich unmittelbar auf die Schiff'sche Base aus, die zunächst im protonierten Zustand vorliegt. Durch die Isomerisierung des Retinals befindet sich dieses Proton der Schiff'schen Base nun in einer energetisch ungünstigen Umgebung und wird an den unmittelbaren Wechselwirkungspartner Asp85 abgegeben (M-Intermediat, welches über die beiden Intermediate K und L erreicht wird). Zusätzlich wird ein Proton aus der Region von Glutamat 194 und 204 an die extrazelluläre Oberfläche abgegeben. Die deprotonierte Schiff'sche Base wird beim M nach N-Übergang von Asp96, welches sich in der cytoplasmatischen Proteinhälfte befindet, reprotoniert. Asp96 wird seinerseits beim N- nach O-Übergang reprotoniert, wobei es hier ein Proton der Cytoplasmaoberfläche aufnimmt. Im letzten Übergang (O nach BR) wird das Retinal durch thermische Reiserisierung wieder in seine all-trans-Form überführt und das Asp85 deprotoniert, indem es ein Proton an die Protonenabgabegruppe in der Region von Glutamat 194 und 204 abgibt. (Kandt, 2003; Kuhne, 2008)

Effektiv führt dies pro Photozyklus bei Absorption eines Photons zu einem Protonentransport von der Cytoplasmaoberfläche zur extrazellulären Oberfläche, wobei jedoch ein konkretes Proton an der Cytoplasmaoberfläche vier Photozyklen benötigt, um an der extrazellulären Oberfläche abgegeben zu werden – in diesem Versuch können jedoch nur drei Zyklen beobachtet werden. In Abbildung 8 ist der Zyklus mit Lage der Absorptionsmaxima in den einzelnen Intermediaten sowie den Übergangszeiten bei Raumtemperatur angegeben – bei Temperaturen kleiner der Raumtemperatur ist dabei der Photozyklus verlangsamt. Aufgrund der veränderten Lage der Absorptionsmaxima verändert sich bei einem Photozyklus auch die Farbe des bR – während es im Grundzustand purpurrot erscheint, verändert es seine Farbe im M-Zustand hin zu gelb.

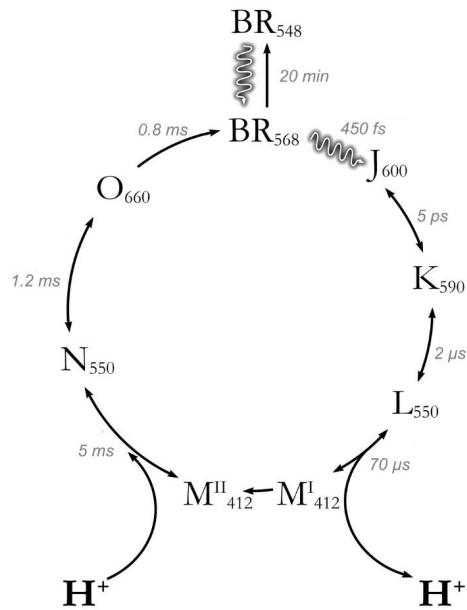


Abbildung 8: Der Photozyklus des Bakteriorhodopsin in vereinfachter Form. Die Indices der Intermediate geben die Lage der Absorptionsmaxima in nm an, Zeiten bei $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aus [Kandt \(2003, S. 18\)](#)).

2.2 IR-Spektroskopie

Die Infrarotspektroskopie stellt ein physikalisches Analyseverfahren dar und gehört zur Gruppe der molekülspektroskopischen Verfahren. Bei den molekülspektroskopischen Verfahren wird der Energieaustausch zwischen elektromagnetischer Strahlung – bei der IR-Spektroskopie wird Strahlung im Wellenlängenbereich von 780 nm bis 1 mm, die Infrarotstrahlung, verwendet – und den Molekülen des Analyten beobachtet⁵. Das Ergebnis wird dabei in Abhängigkeit von der Frequenz, der Wellenlänge, der Wellenzahl⁶ oder der Energie

⁵ Ausnahme hierbei ist die Massenspektroskopie, die ebenfalls zu den molekülspektroskopischen Verfahren gehört, jedoch nicht mit elektromagnetischer Strahlung arbeitet.

⁶ In der Spektroskopie wird häufig die Wellenzahl statt der Wellenlänge verwendet und ist definiert als der Kehrwert der Wellenlänge. Die üblicherweise verwendete Einheit ist cm^{-1} , als Symbol wird häufig $\tilde{\nu}$ verwendet.

als *Spektrum* aufgezeichnet. Moleküle zeigen bei bestimmten Wellenlängen ein charakteristisches Verhalten, die als sogenannte *Banden* im Spektrum sichtbar sind, und erlauben Rückschlüsse auf Strukturelemente. Hierdurch ist es möglich, sowohl eine Identifizierung anhand der charakteristischen Banden durchzuführen als auch Strukturaufklärung zu betreiben.

Die grundlegende Gesetzmäßigkeit eines absorptionspektroskopischen Verfahrens, bei der die Intensität der transmittierten elektromagnetischen Strahlung durch eine Probe bestimmt wird – zu dieser Klasse gehört auch die IR-Spektroskopie –, ist das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$I_{\tilde{\nu}}(x) = I_0 \exp\{-\kappa_{\tilde{\nu}}x\} \quad (2.1)$$

mit dem wellenzahlabhängigen Absorptionskoeffizienten $\kappa_{\tilde{\nu}}$ und der Probenlänge x . Als Maß für die Abschwächung der transmittierten Strahlung wird die Extinktion $E_{\tilde{\nu}}$ verwendet, die definiert ist als

$$E_{\tilde{\nu}} = -\log_{10}(I_{\tilde{\nu}}/I_0) \quad (2.2)$$

und bei Auftragung der Extinktion über die Wellenzahl (oder Wellenlänge) als Extinktionsspektrum bezeichnet wird.

Besitzen Moleküle permanente Dipolmomente oder können induzierte Dipolmomente ausbilden, so kann durch Absorption von IR-Strahlung, deren Energie mit den Eigenenergien des Moleküls übereinstimmt, das Molekül zu Vibrationen oder Rotationen angeregt werden. Dies bedeutet, dass der Absorptionskoeffizient abhängig von der Wellenlänge ist und somit auch die Extinktion – zu beobachten sind Extinktionsmaxima und -minima (die Absorptionsbanden). Je komplexer ein Molekül ist, desto mehr Banden sind zu beobachten, die sich auch überlagern können und dadurch eine Zuordnung der Banden zu den einzelnen Strukturen des Moleküls erschweren oder gar unmöglich machen. Veränderungen des

Moleküls zeigen dabei direkt ein anderes Extinktionsspektrum, da dies zu Veränderungen der Eigenschwingungen führt. Dies wird bei der Analyse von komplexen Molekülen in der Differenzspektroskopie ausgenutzt. Durch Änderungen von Bindungen bei einzelnen Reaktionsschritten oder dem gezielten Austausch von Atomen mit dessen Isotopen (hier ändern sich durch die unterschiedlichen Massen die Eigenschwingungen, jedoch *nicht* die chemischen Eigenschaften) können die Spektren vor und nach der Änderung miteinander verglichen werden und die beteiligten Gruppen isoliert werden.

2.2.1 IR- versus FTIR-Spektroskopie

Abhängig vom zu untersuchenden Spektralbereich kommen für beide Techniken, IR- und FTIR-Spektroskopie, die selben Strahlungsquellen zum Einsatz. Für den nahen bis mittleren Infrarotbereich (NIR/MIR, Wellenlängenbereich $0,8 \dots 2,5 \mu\text{m}$) kommen die kontinuierlichen, thermischen Strahlungsquellen (annähernd Planck'sche Strahler) Globar ($\lambda = 1 \dots 40 \mu\text{m}$), Nernststifte ($\lambda = 0,4 \dots 20 \mu\text{m}$) und Chrom-Nickel-Drähte ($\lambda = 0,75 \dots 20 \mu\text{m}$) zum Einsatz (Harvey, 2000) – in diesem Versuch wurde ein Globar als Strahlungsquelle eingesetzt. Auch die Wahl des Detektors unterscheidet sich bei den beiden Techniken nicht grundsätzlich, hier stehen verschiedene Detektoren zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Reaktionszeit und Detektionslimit unterscheiden (siehe z. B. McCarthy und Kemeny (2001)). Häufig, wie auch in diesem Versuch, wird ein HgCdTe-Detektor (engl. MCT) eingesetzt, der eine schnelle Reaktionszeit und eine sehr hohe Sensitivität aufweist. Nachteil dieses Detektors ist, dass dieser mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden muß, da die zu detektierenden Photonenenergien im Bereich der thermischen Energien bei Raumtemperatur liegen und somit eine Detektion nicht oder nur mit einem

schlechten Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis möglich wäre.

Bei der IR-Spektroskopie wird das von der Probe transmittierte Licht durch ein dispersives Element (Prisma oder Gitter) spektral zerlegt und schmale Wellenlängenbereiche durch Spiegel und Blenden auf den Detektor gelenkt (die Kombination aus dispersiven Element, Spiegel und Blenden fungiert als Monochromator). Durch Veränderung des Strahlengangs (Spiegelstellung) oder der Detektorposition kann dann der zu untersuchende Wellenlängenbereich abgefahren und detektiert werden. Nachteil dieser Methode ist die Dauer einer Messung und eignet sich daher nur eingeschränkt für die zeitkritische Analytik, sondern eher für zeitlich stabile Proben.

Im Gegensatz dazu wird bei der FTIR zeitgleich das gesamte Spektrum aufgenommen – in Form eines Interferogramms – und mittels Fouriertransformation in ein Spektrum umgerechnet – der Vergleich zweier solcher Spektren liefert anschließend ein Extinktionsspektrum. Die zeitgleiche Aufnahme erfordert aber einen wesentlich höheren technischen Aufwand als bei der IR-Spektroskopie. Neben der Notwendigkeit, die Fouriertransformation durchzuführen (mittels Computer) wird ein Michelson-Interferometer sowie ein Laser zur genauen Positionsbestimmung des beweglichen Spiegels benötigt (siehe Abbildung 9).

Die kontinuierliche IR-Strahlung der IR-Strahlungsquelle wird über eine Blende in das Interferometer eingekoppelt und am Strahlteiler in zwei Teilstrahlen, die senkrecht zueinander angeordnet sind, aufgeteilt. Einer der Teilstrahlen wird an einem festen Spiegel reflektiert, durchläuft ohne Richtungsänderung des Strahlteiler sowie die Probe und trifft auf den Detektor. Der zweite Teilstrahl wird an einem beweglichen Spiegel reflektiert, am Strahlteiler um 90° abgelenkt, durchläuft ebenfalls die Probe und trifft auf den Detektor. Beide

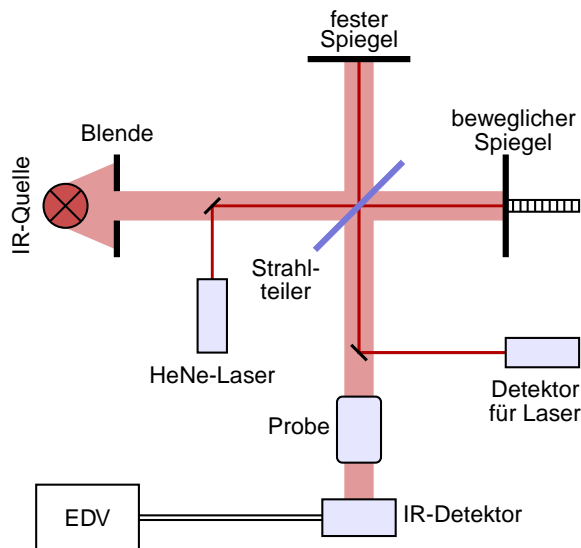


Abbildung 9: FTIR-Spektrometer

Teilstrahlen interferieren miteinander – abhängig von der Position des beweglichen Spiegels verändert sich die Interferenzamplitude. Bei monochromatischem Licht würde bei einem Längenunterschied der beiden Teilarme von $\lambda/4$ eine destruktive Interferenz auftreten, bei gleichlangen oder einem Längenunterschied von $\lambda/2$ konstruktive Interferenz (maximale Intensität). Wird stattdessen polychromatische Strahlung verwendet, ist die maximale Intensität nur bei gleichen Längen der beiden Arme zu beobachten, da hier alle Wellen konstruktiv miteinander interferieren. Bewegt man einen Spiegel nun von dieser Ausgangsposition weiter weg, so wird eine Abnahme der maximalen Amplitude beobachtet, da nicht mehr alle Wellen konstruktiv miteinander interferieren. Aus der Ortskoordinate des beweglichen Spiegels und der gemessenen Amplitude kann dann mittels Fouriertransformation das ortsabhängige Spektrum in ein wellenzahlabhängiges Spektrum transformiert werden.

Der analysierbare Spektralbereich wird zu kürzeren Wellenlängen hin durch den Abstand der Messpunkte im Interferogramm begrenzt und das erreichbare Auflösungsvermögen

hängt, neben der Gesamtweglänge, die der Spiegel durchläuft, wesentlich von der Ortsbestimmung des beweglichen Spiegels ab. Dies kann jedoch verhältnismäßig einfach und mit hoher Präzision über die monochromatische Interferenz eines Laserstrahls erfolgen. Hierzu wird (siehe Abbildung 9) zusätzlich ein HeNe-Laserstrahl in den Strahlengang des Interferometers eingekoppelt, noch vor der Probe wieder ausgekoppelt und zu einem eigenen Detektor gelenkt. Die periodische Modulation der Laserstrahlintensität durch selbstinterferenz kann für die Positionsbestimmung des Spiegels verwendet werden, bei entsprechend stabilen Lasern kann eine sehr hohe Wellenzahlgenauigkeit hin bis zu $0,001 \text{ cm}^{-1}$ erreicht werden.

Zusammengefasst lassen sich folgende Vorteile der FTIR- gegenüber der dispersiven IR-Spektroskopie aufzählen:

- ▶ Während der Messung trägt stets der *gesamte* Spektralbereich zum Signal bei, während bei einem Monochromator jeweils nur ein schmaler Ausschnitt daraus auf den Detektor gelangt. Dieser *Multiplex-Vorteil* verkürzt die Messzeit wesentlich.
- ▶ Statt schmaler (Monochromator-)Spalte, die für ein hohes Auflösungsvermögen in der IR-Spektroskopie erforderlich sind, jedoch den Strahlungsfluss begrenzen, können größere Blenden verwendet werden. Damit kann die Signalintensität und somit das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert werden (*Jaquinot-Vorteil*).
- ▶ Durch Einsatz eines Lasers für die Positionsbestimmung der Spiegel kann eine sehr hohe Wellenzahlgenauigkeit und somit eine hohe Auflösung erreicht werden (*Connes-Vorteil*).

Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass es sich um ein indirektes Messverfahren handelt,

wodurch die Fehlererkennung erschwert wird. Zusätzlich stellt dies hohe technische Anforderungen (stabile Laser, aufwendige Transformation und dadurch bedingten Rechneinsatz) und somit Kosten dar.

3 Durchführung der Messung

Bei dem verwendeten FTIR-Spektrometer handelt es sich um eine kompakte und abgekapselte Einheit. Die Bedienung des Gerätes ist nahezu vollständig über eine spezielle PC-Software realisiert, so dass alle relevanten Einstellungen am PC-Bildschirm zeitsparend durchgeführt werden können. Vor Beginn der Messung ist die zu untersuchende bR-Probe einzubauen sowie die Kühlung des HgCdTe-Detektors mittels flüssigen Stickstoff sicherzustellen. Um die Wartezeit bis zur Dunkeladaption der Probe zu vermeiden ist es zweckmäßig, eine vorgekühlte und dunkeladaptierte Probe zu verwenden. Die Temperatur der Probe wird während der gesamten Messung mithilfe eines Umlaufthermostats bei einem konstanten Wert von 5 °C gehalten – diese Kühlung sorgt einerseits für konstante Analysebedingungen, andererseits wird die Protonenpumpe hierdurch verlangsamt und ermöglicht damit einen besseren messtechnischen Zugang.

3.1 Beurteilung der Probenqualität

In der (FT)IR-Spektroskopie kann der Wassergehalt einer Probe entscheidend für die Qualität der Messergebnisse sein, da Wasser im IR-Bereich stark ausgeprägte Banden besitzt und Banden der Probe hierdurch überlagert werden können. bR benötigt einerseits Wasser, damit der Photozyklus überhaupt durchlaufen werden kann. Andererseits erhöht eine hohe Wasserkonzentration die Absorption im Bereich der Amid-I-Bande bei ca. 1660 cm⁻¹.

Durch die Überlagerung der Absorptionsbanden von Wasser mit der Amid-I-Bande verringert sich die Transmittivität in diesem Bereich, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis und somit die Qualität des Messsignals in diesem Spektralbereich ebenfalls sinken.

Vor Beginn der Messungen konnte anhand des Wassergehalts der Probe die Probenqualität abgeschätzt werden. Hierzu wurde ein FTIR-Einkanalspektrum im Wellenzahlbereich von 1000 cm⁻¹ bis 1900 cm⁻¹ mit einer spektralen Auflösung von 4 cm⁻¹ aufgenommen. Unter Zuhilfenahme der PC-Software OPUS sind die Werte für die Spiegelgeschwindigkeit schrittweise auf 320 kHz erhöht worden⁷, wobei die Apertur 5 mm und die Anzahl der Mittlungen 200 betragen. Die gemessene Intensität I_{mess} im Wellenzahlbereich der Amid-I-Bande soll hierbei mindestens 10 % der maximalen Intensität I_{max} betragen. Der mit Hilfe der PC-Software OPUS ermittelte Wert für die Intensität I_{mess} lag lediglich bei 5 %. Folglich ist der Wassergehalt der Probe zu hoch und die verwendete Probe demzufolge von geringerer Qualität (Hauser, 2000). Auf ein drehen oder verschieben der Probe, um einen Bereich der Probe zu finden, in dem eine geringere Wasserkonzentration vorliegt (die Wasserverteilung ist inhomogen in der bR-Probe), wurde verzichtet und erwartet wird für die folgenden Messungen ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis.

3.2 Licht-Dunkel-Differenzspektrum

Bei der Differenzspektroskopie werden die spektralen Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Zuständen einer Probe aufgezeigt. Dazu wird zunächst das Referenzspektrum der dunkeladaptierten Probe aufgenommen. Die Einstellungen am Spektrometer entsprechen dabei denjenigen aus dem vorherigen Ab-

⁷ Dies ist die Anzahl der abgetasteten Nulldurchgänge des Lasersignals pro Sekunde, siehe Abschnitt 2.2.1.

schnitt. Anschließend wird die Probe mit Hilfe des zuvor gestarteten Pulslasers eine Minute lang belichtet. Um eine unbeabsichtigte Inbetriebnahme des Pulslasers zu vermeiden erfolgt die Lasersteuerung über eine individuelle PC-Software in Kombination mit einer externen Steuerungseinheit. Es wurden fünf Transmissionsspektren der lichtadaptierten Probe aufgenommen, siehe Tabelle 1.

i	Zeit nach ausschalten des Lasers
1	direkt
2	eine Minute
3	zwei Minuten
4	sieben Minuten
5	zwölf Minuten

Tabelle 1: Zeiten der Messungen für die Licht-Dunkel-Differenzspektroskopie

Mit Hilfe der PC-Software OPUS konnten die aufgenommenen Transmissionsspektren mit dem Referenzspektrum der dunkeladaptierten Probe in Bezug gebracht und die Differenzspektren berechnet werden. Anschließend wurden diese Differenzspektren in Abbildung 10 (im Anhang) graphisch dargestellt, wobei den charakteristischen Peaks entsprechende Wellenzahlen zugeordnet wurden. Gemäß den Wellenzahlen lassen sich die an der Reaktion beteiligten Teile des Proteins identifizieren, deren Zuordnung man Tabelle 2 entnehme. Aus der Zuordnung in Tabelle 2 wird auch ersichtlich, dass die Schwingungen bei Doppelbindungen von gleichen Atomen bei höheren Wellenzahlen absorbieren als diejenigen mit Einfachbindungen. Dies ist dadurch begründet, dass eine Doppelbindung eine stärkere und starrere Bindung kennzeichnet, was einer höheren „Federkonstanten“ zwischen den beiden Atomen entspricht (wenn man das Modell zweier Kugeln mit einer Feder verwendet). Eine höhere Federkonstante hat aber eine höhere Schwingungsfrequenz zur

Folge, also einer höheren Wellenzahl. Anzumerken sei noch, dass bei Doppelbindungen keine Rotationsschwingungen auftreten können, sondern nur Biege- oder Streckschwingungen.

Zu erwarten ist, dass nach ausschalten der Belichtung der lichtadaptierte Zustand der bR-Probe (siehe Abschnitt 2.1.4) in den dunkeladaptierten Zustand zerfällt. Abbildung 10 zeigt also die Veränderung der bR-Probe durch den lichtadaptierten Zustand, die Peaks sollten aufgrund der Relaxation in den dunkeladaptierten Zustand im zeitlichen Verlauf niedriger werden und bei der Rückkehr in den dunkeladaptierten Zustand keine Extinktion zu beobachten sein. Wie jedoch an Abbildung 10 zu erkennen ist, senkt sich die Grundlinie bereits im zeitlichen Verlauf (gut im Bereich $\tilde{\nu} > 1700 \text{ cm}^{-1}$ zu beobachten), was auf eine zeitlich instabile Probe oder andere zeitlichen Instabilitäten im Aufbau hinweist. Der erwartete Verlauf, dass die Höhe der Peaks mit der Zeit abnimmt, ist unter Berücksichtigung der Basislinienverschiebung nur bei kleineren Wellenzahlen zu beobachten, bei höheren ist dies nicht zu beobachten.

3.3 Fast-Scan-Messung

Für die Durchführung der folgenden Messung wird über die PC-Software OPUS ein Makro gestartet. Dieses synchronisiert die Bewegung des beweglichen Spiegels am Michelson-Interferometer mit den Laserpulsen des Belichtungslasers. Insgesamt werden während der Messung 200 Messzyklen durchfahren, wobei 32 Interferogramme je Zyklus aufgenommen und gespeichert werden. Nach Abschluss der Messung erfolgt eine Mittlung über alle 200 Messzyklen. Aus den erhaltenen Interferogrammen werden automatisch die Spektren berechnet und in eine einzige Datei als dreidimensionaler Datensatz abgelegt. Für die Aus-

wertung der Kinetik sind die Hauptbanden bei folgenden Wellenzahlen von Interesse:

$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]	Proteinteil
1758	Asp85
1742	Asp96
1527	Rückgrat
1186	Schiff'sche Base

Erwartet wird dabei, dass die Extinktion bei einer Protonierung steigt und bei einer Deprotonierung fällt – dies liegt darin begründet, dass bei einer Protonierung die Absorptionsfrequenz verschoben wird. Durch Auswertung der Kinetik dieser Banden können Aussagen über deren Protonierungszustand während des Photozyklus getroffen werden (Abbildung 13–16). Die weitere Analyse der Daten wird auf einem Linux-PC unter Zuhilfenahme der numerischen Mathematiksoftware Matlab durchgeführt, wobei ein sogenanntes Global-Fit-Modell Anwendung findet. Bei diesem Modell geht man davon aus, dass die einzelnen Übergänge zwischen den Intermediaten beim Photozyklus des bR Reaktionen erster Ordnung darstellen. Demzufolge lassen sich deren Zeitverläufe durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschreiben (Bolwien, 2002). Die Global-Fit-Analyse wurde zunächst mit nur einer Exponentialfunktion durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine monoexponentielle Anpassung der Messdaten nicht ausreichend ist. Die zeitliche Intensitätsänderung der Asp85-Bande wird durch diese hinreichend gut beschrieben, die Kinetik der Schiff'schen Base dagegen nicht (siehe Abbildung 11).

Eine gute Anpassung an die Messdaten wurde mit einer biexponentiellen Funktion erreicht (Abbildung 12–16). Dies scheint plausibel, da die eine Exponentialfunktion die Anregung eines Zustandes, die zweite eine Abregung

beschreibt – daraus folgt auch, dass die Zeitkonstante der Anregung kürzer sein muss als diejenige der Relaxation, so dass die Zustandsänderung sichtbar wird. Mittels der durchgeführten Global-Fit-Analyse konnten zwei Zeitkonstanten $\tau_1 = 9,3$ ms und $\tau_2 = 37,2$ ms ermittelt werden. Für die erhaltenen Zeitkonstanten konnten entsprechende Literaturwerte ermittelt werden (Rammelsberg (1999): $\tau_1 \approx 3$ ms, $\tau_2 \approx 32$ ms bei $T = 20^\circ\text{C}$; Gerwert et al. (1990): $\tau_1 \approx 2$ ms, $\tau_2 \approx 29$ ms bei $T = 5^\circ\text{C}$). Die Abweichung zwischen Literatur und Messwert ist vor allem bei τ_1 relativ groß.

Die Lebensdauer der Intermediaten beim bR-Photozyklus hängt von der Temperatur ab, bei der die Reaktion abläuft. Durch Absorption eines Photons wird beim bR der Photozyklus initiiert, wobei die nachfolgenden Zwischenschritte J bis BR (vgl. Abbildung 8) thermisch durchlaufen werden. Wird die Temperatur der bR-Probe verringert, so wirkt sich dieses stabilisierend auf die Lebensdauer der Intermediaten aus. Die Dauer des Photozyklus kann damit wesentlich verlängert werden. Bei hinreichend tiefen Temperaturen ist es möglich, den Photozyklus in einem bestimmten Intermediaten „einzufrieren“. Entsprechend Gerwert et al. (1990) liegen Literaturwerte vor, die bei gleicher Proben temperatur bestimmt wurden. Demnach kann eine mögliche Temperaturdifferenz als Begründung für diese Abweichung nicht herangezogen werden.

Möglicherweise lässt sich der Unterschied zwischen Literatur und Messwert auf das aus der geringen Probenqualität resultierende schlechte Signal-Rausch-Verhältnis zurückführen. Darüber hinaus ist nicht bekannt, bei welchem pH-Wert und gegebenenfalls Druck der bR-Probe die Messdaten erfasst wurden, so dass deren Einfluss auf die Lebensdauer nicht untersucht werden kann. Weiterhin kann mangels der erforderlichen Software nicht überprüft werden, ob der Fehler an der durchgeführten Global-Fit-Analyse liegt.

Wovon hier nicht auszugehen ist – aber prinzipiell zu einer Veränderung der Lebensdauer führt – ist die Untersuchung eines bR-Mutanten statt dem Wildtyps. Beispielsweise wird beim bR-Mutanten BR-D96N die 96 Aminosäure Aspartat (D) gegen Asparagin (N) ausgetauscht. Dieser Austausch kann eine deutliche Verlängerung der Lebensdauer von Intermediat M bewirken, da bedingt durch die Abwesenheit von Asp96 die Reprotonierung der Schiff'schen Base verzögert abläuft. Durch die Zugabe von Azid lässt sich die Lebensdauer des Zwischenzustandes M beim Mutanten BR-D96N wieder verkürzen.

Die Zeitkonstante τ_1 beschreibt die Protonierung der Schiff'schen Base als auch die Deprotonierung von Asp96 beim Übergang von Intermediat M nach N – das Maximum der Protonierung bzw. Deprotonierung liegt bei ~ 20 ms vor. Abbildung 14 und 16 zeigen, dass diese beiden Vorgänge zeitgleich erfolgen, also Asp96 sein Proton an die Schiff'sche Base abgibt (vgl. Abschnitt 2.1.4). Die Zeitkonstante τ_2 beschreibt die Deprotonierung von Asp85 und die Wiederherstellung des Grundzustandes (Abbildung 13) nach ca. 100 ms. Der Protonenakzeptor Asp85 wird von der Schiff'schen Base beim Übertritt von L zum M Intermediat protoniert. Die Deprotonierung von Asp85 erfolgt während das Protein relaxiert, wobei der Übergang vom Intermediat O zu BR vollzogen wird.

Asp96 wird mit der Zeitkonstanten τ_1 deprotoniert, wobei die entsprechende Hauptbande entsteht (Abbildung 14). Die Protonierung wird durch τ_2 wiedergegeben während das Protein den Grundzustand annimmt. Asp96 wird beim Übergang von Zwischenzustand M zu N deprotoniert. Der Protonendonator Asp96 reprotoniert dabei die Schiff'sche Base. Beim Übergang von N zum O Intermediat nimmt Asp96 wieder ein intrazelluläres Proton auf.

Die Kinetik des Peptidrückgrats gibt die Konformationsänderung des Retinals bei der Relaxation des Proteins mit der Zeitkonstanten τ_2 wieder (Abbildung 15) – die Relaxation ist ebenfalls nach etwa 100 ms abgeschlossen.

Die Schiff'sche Base ist ausschließlich im Intermediat M deprotoniert vorzufinden, wobei diese beim Übergang von M zum N Intermediat von Asp96 reprotoniert wird (Abbildung 16). Die Hauptbande der Schiff'schen Base entsteht mit einer Zeitkonstanten τ_1 , wobei dies die Reprotonierung der Schiff'schen Base ausdrückt. Der Zerfall der Hauptbande mit der Zeitkonstanten τ_2 kennzeichnet die Rückkehr des Proteins in den Grundzustand, dabei ist die Schiff'sche Base immer noch protoniert. Daraus lässt sich folgern, dass das Retinal die all-trans-Form angenommen hat. Im Grundzustand ist die Schiff'sche Base immer protoniert, wobei die Bande nur auftritt, wenn das Retinal in der 13-cis-Form vorliegt.

Vergleicht man die Amplitudenspektren zu den Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 mit den realen Messwerten zu diesen Zeiten, so wird deutlich, dass diese unterschiedlich gut übereinstimmen (siehe Abbildung 17). Das Amplitudenspektrum zu der Zeitkonstanten τ_2 ist bis auf eine Intensitätsdifferenz nahezu analog zu dem Messwert bei 43 ms. Hingegen weist das Amplitudenspektrum bezüglich τ_1 deutliche Unterschiede in Intensität und Verlauf im Vergleich mit dem realen Messwert bei 8 ms – jedoch große Ähnlichkeit mit den realen Messwerten zu Zeit 43 ms und somit auch zum Amplitudenspektrum zur Zeitkonstanten τ_2 . Diese Unterschiede liegen darin begründet, da bei späteren Zeiten die erste Exponentialfunktion bereits abgeklungen ist und nur noch die zweite Exponentialfunktion für die letzten Änderungen repräsentativ ist. Daher stimmt das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstanten τ_2 mit den Extinktionen zu späteren Zeiten überein, während bei früheren Zeiten die Extinktion von beiden Zeitkonstanten beeinflusst

wird, was zur Folge hat, dass Unterschiede zu beobachten sind. Zu beachten ist hierbei, dass sich Differenz- und Amplitudenspektren auf unterschiedliche Bezugspunkte beziehen – während sich Differenzspektren jeweils auf den Grundzustand beziehen, ist bei Amplitudenspektren der Bezugspunkt der Zustandsübergang.

4 Fazit

Bei den durchgeführten Untersuchungen des Mechanismus der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin mittels zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie konnte dessen Photozyklus nachvollzogen werden. Desweiteren konnte die wissenschaftliche Suche bei der Identifikation der einzelnen Peaks im Licht-Dunkel-Differenzspektrum geschult werden.

Anhang: Tabellen und Spektren

i	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]	beteiligte Teile des Proteins
1	1665	Amid-I und Wasser, C = O Streckschwingung [2]
2	1642	protonierte Schiff'sche Base, C = NH ⁺ Streckschwingung [4,6]
3	1579	C ₁₄ = C ₁₅ Streckschwingung [5]
4	1538	Amid-II, N – H Biegeschwingung [1]
5	1526	Ethylenbande des Chromophors, C = C Streckschwingung [6]
6	1445	CH ₃ Deformationsschwingungen [3,5]
7	1345	N – H Biegeschwingung in der Ebene der Schiff'schen Base gekoppelt mit C ₁₅ – H Deformationsschwingung [6]
8	1254	Kopplung von Moden im Bereich der Schiff'schen Base mit Moden von Lysin 216 (N – H und C ₁₅ – H Biegeschwingungen) [6]
9	1214	Fingerprint-Bereich [5,6], C ₈ – C ₉ Streckschwingung
10	1201	Fingerprint-Bereich [2,6], C ₁₄ – C ₁₅ Streckschwingung (all-trans-Form) [2]
11	1182	Fingerprint-Bereich [2], C ₁₄ – C ₁₅ Streckschwingung (13-cis-Form) [2]
12	1169	Fingerprint-Bereich [2], C ₁₄ – C ₁₅ Streckschwingung (all-trans-Form) [2]
13	1124	Fingerprint-Bereich, C – C Streckschwingung vom bR ₅₆₈ [7,8]
14	1075	?

Tabelle 2: Zuordnung der Peaks im Differenzspektrum

Referenzen für die Zuordnungen:

[1] Kuhne (2008), [2] Herbst (2002), [3] Peters (2005), [4] Gerwert et al. (1990), [5] Smith et al. (1987), [6] Hauser (2000), [7] Terpugov und Degtyareva (2001), [8] Terner et al. (1977)

Für die Absorptionsbanden bei 1075 cm⁻¹ konnte keine Zuordnung gefunden werden.

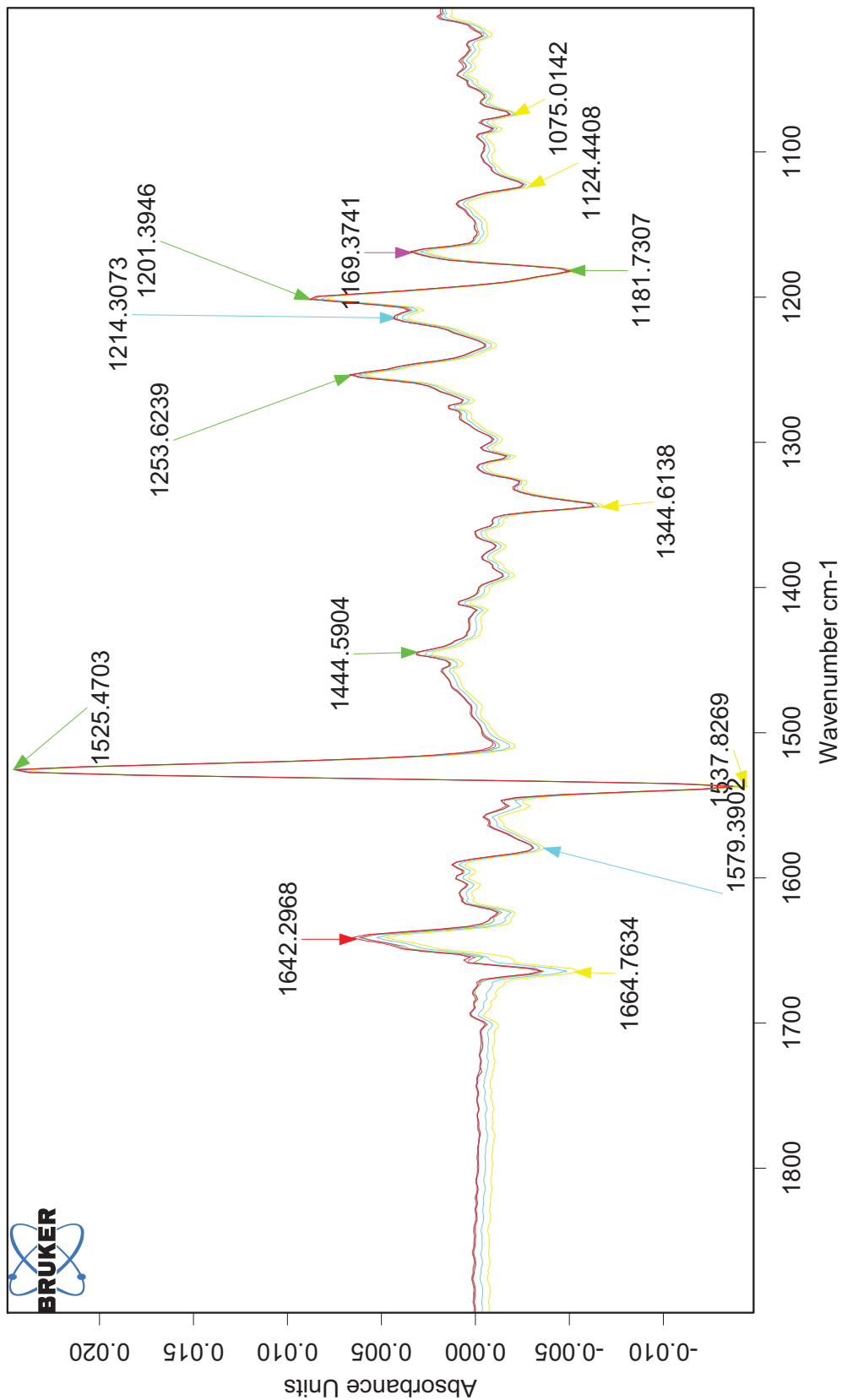


Abbildung 10: Differenzspektren der lichtadaptierten zur dunkeladaptierten Probe.

Farbkodierung für Zeit nach ausschalten des Lasers: orange: direkt; grün: 1 min; blau: 2 min; rot: 7 min; gelb: 12 min;

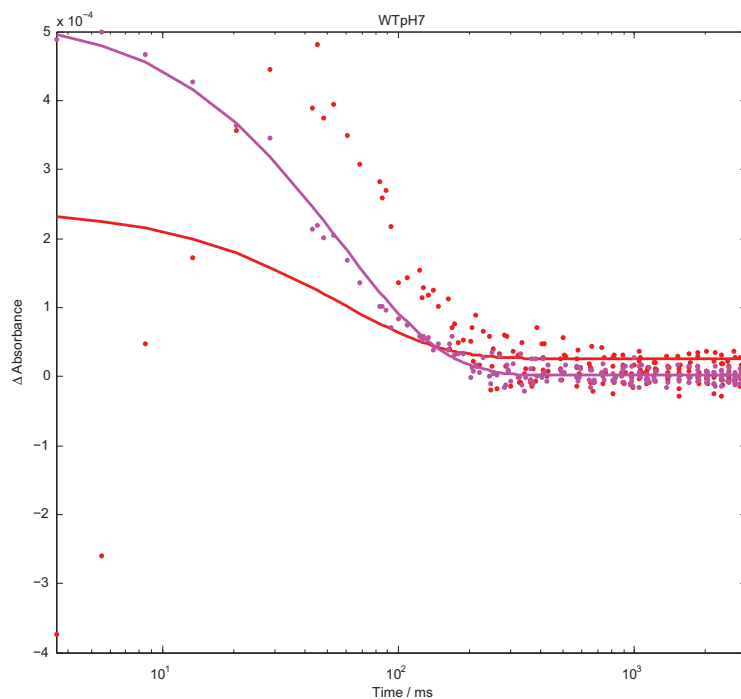


Abbildung 11: Monoexponentieller Global-Fit für **Aspartat 85** und **Schiff'sche Base**. Aus den Abweichungen zwischen Messwerten und Modell wird ersichtlich, dass ein monoexponentieller Ansatz für die Beschreibung nicht ausreicht.

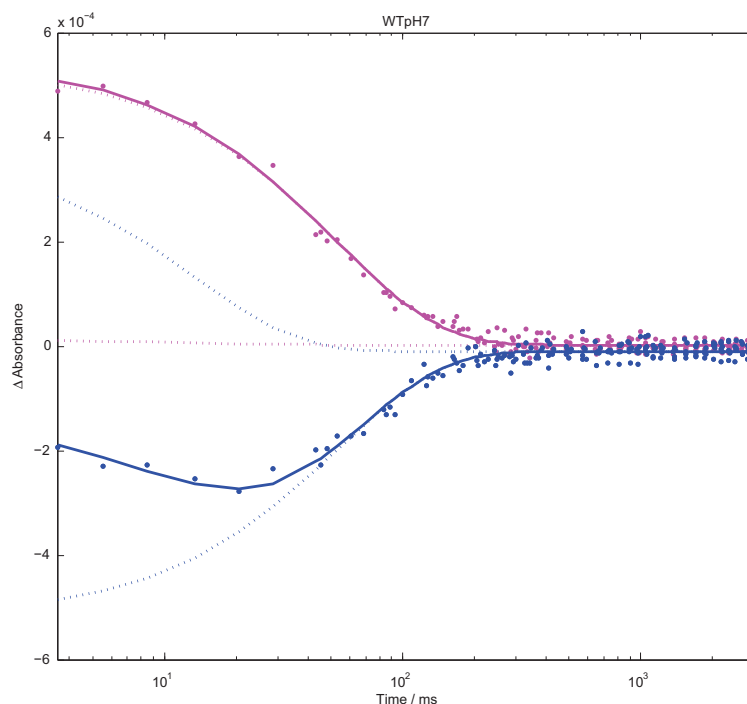


Abbildung 12: Biexponentieller Global-Fit am Beispiel von **Aspartat 85** und **Aspartat 96**, ersichtlich ist die gute Übereinstimmung zwischen Messwerten und Modell.

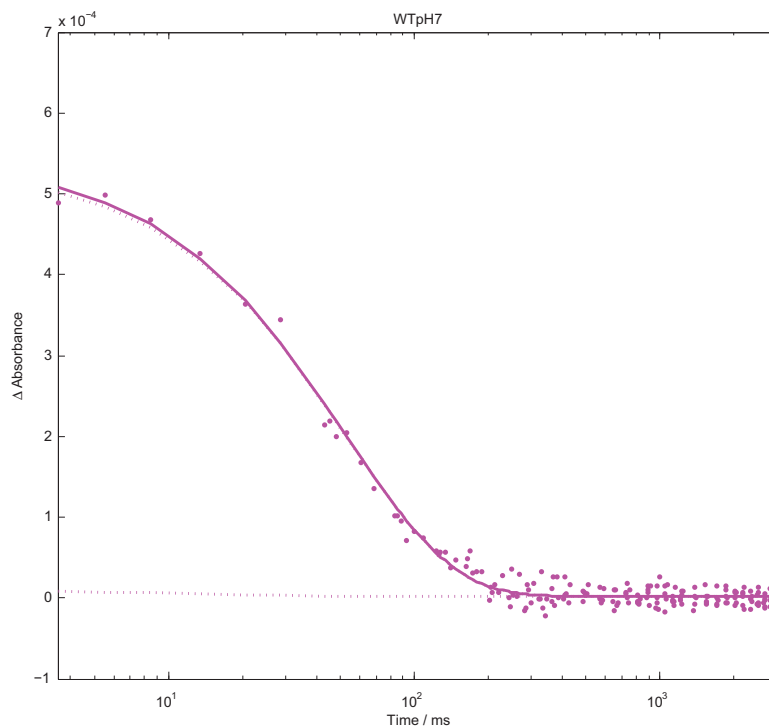


Abbildung 13: Kinetik der Aspartat 85 Hauptbande ist nahezu ausschließlich anhand τ_2 wiedergegeben, nach ~ 100 ms ist der Grundzustand erreicht.

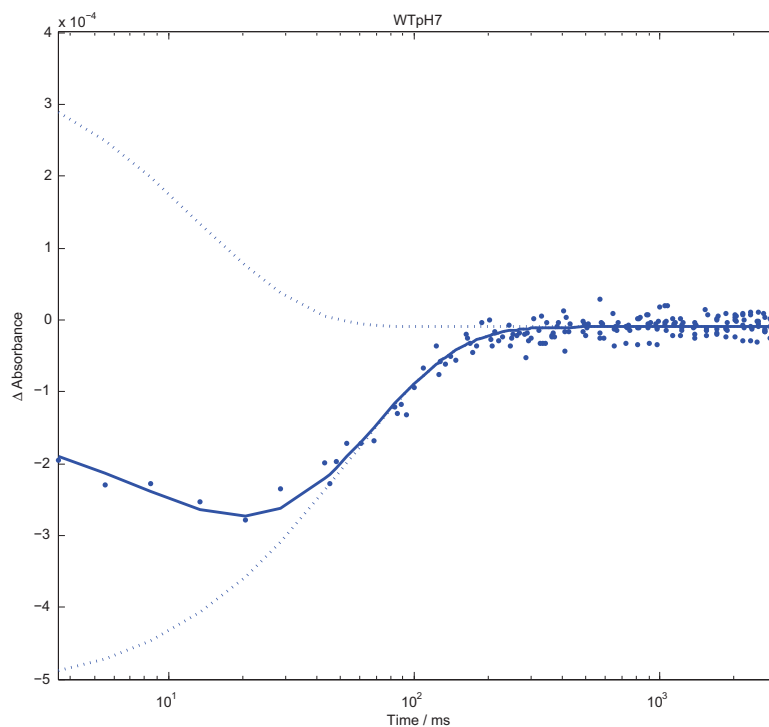


Abbildung 14: Kinetik der Aspartat 96 Hauptbande, das Maximum der Deprotonierung wird nach ~ 20 ms erreicht.

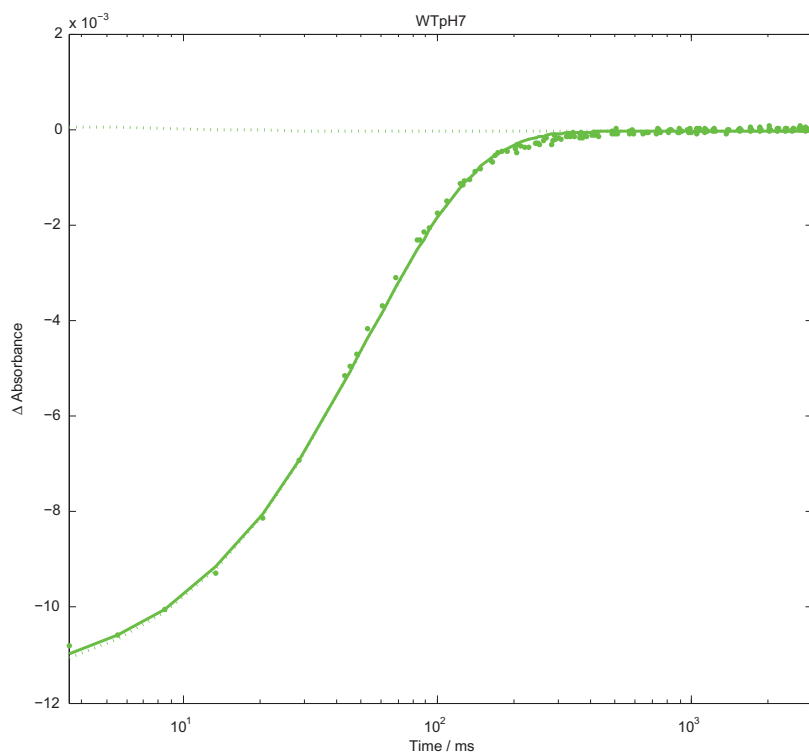


Abbildung 15: Kinetik des Peptidrückgrats, invers zu Aspartat 85 (Abbildung 13).

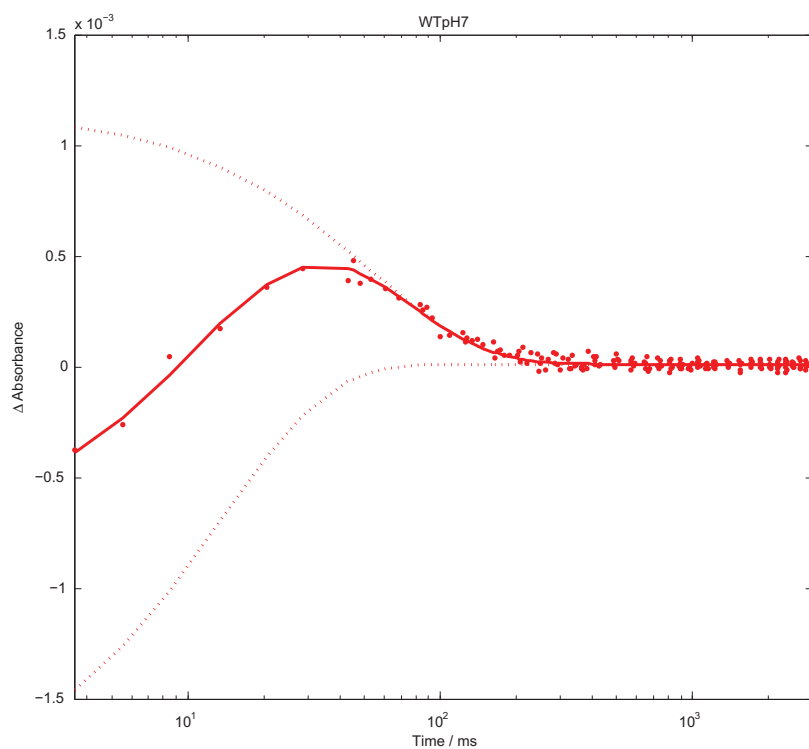


Abbildung 16: Kinetik der Schiff'schen Base, invers zu Aspartat 96 (Abbildung 14)

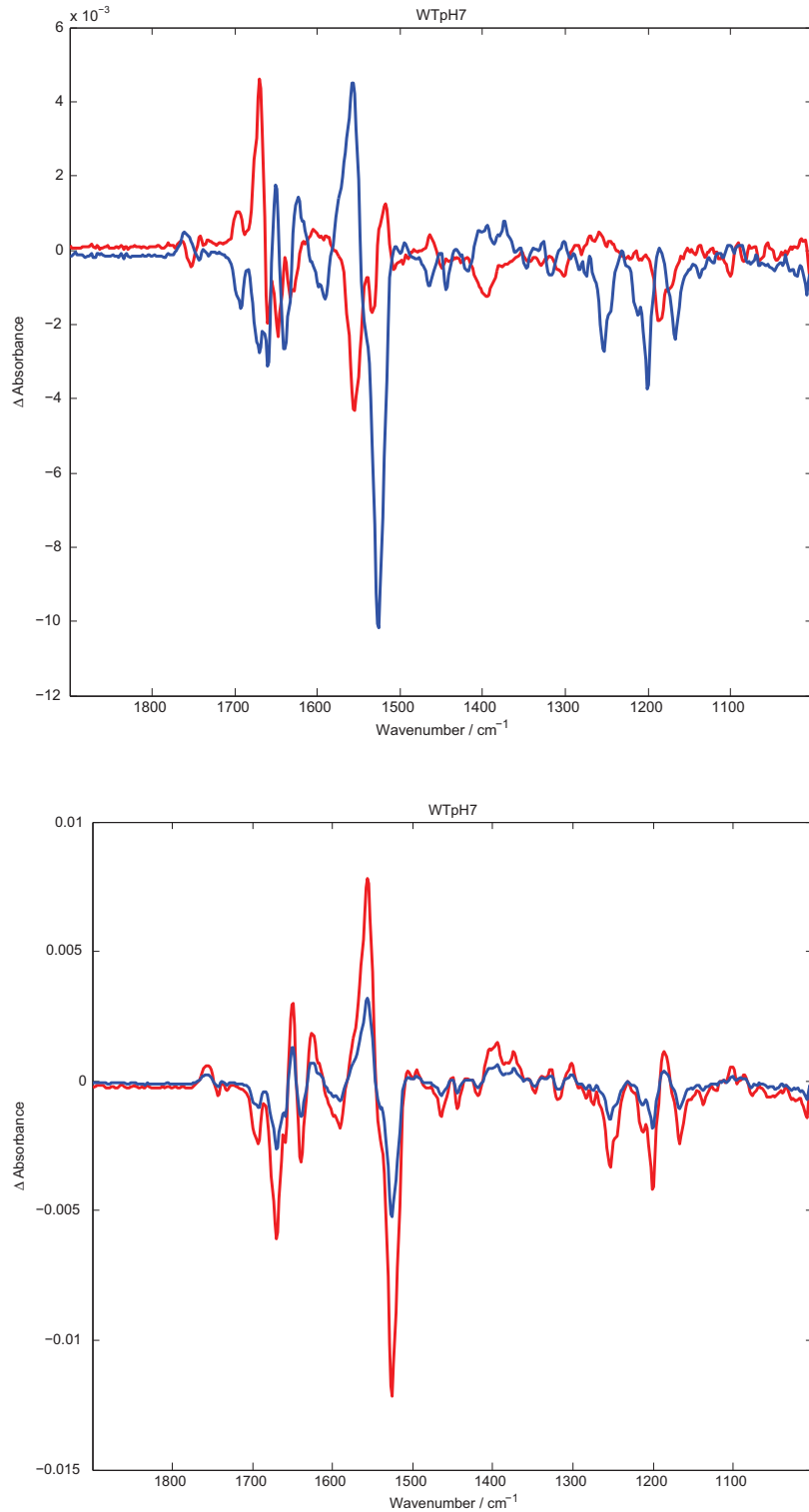


Abbildung 17: Amplitudenspektren (rot) zu den beiden Zeitkonstanten τ_1 oben und τ_2 unten mit den jeweiligen realen Messwerten (blau) in diesem Zeitbereich (8,4 ms oben und 43,4 ms unten).

Literatur

- Carsten Bolwien. Zeitauflösende Schwingungsspektroskopie an Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin. Bericht Jül-3945, Forschungszentrum Jülich. Institut für Biologische Informationsverarbeitung. Institut 2: Biologische Strukturforschung, 2002. ISSN 0944-2952.
- Klaus Gerwert, Georg Souvignier, und Benno Hess. Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24):9774–9778, 1990.
- David Harvey. *Modern Analytical Chemistry*. McGraw-Hill, 2000. ISBN 0-07-116953-9.
- Siegfried Hauptmann. *Einführung in die organische Chemie*. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH, Leipzig, 4., durchgesehene Auflage, 1992. ISBN 3-342-00635-8.
- Karin Hauser. *FTIR-Differenzspektroskopie zur Untersuchung von Konformationsänderungen in Proteinen*. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Fakultät für Chemie und Pharmazie, 2000.
- Johannes Herbst. *Charakterisierung der Photoisomerisierung in Bakteriorhodopsin durch Femtosekunden-Infrarot-Schwingungsspektroskopie*. Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Physik, 2002.
- Christian Kandt. *Theoretische Untersuchungen integrierender photosynthetischer Membranproteine*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Biophysik, Arbeitsgruppe Theoretische Biophysik, 2003.
- Jens Kuhne. *F-Praktikumsversuch 701. Zeitaufgelöste Fouriertransformierte-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) an Bakteriorhodopsin*. Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum, 2008. Versuchsanleitung, Version vom 16.09.2008.
- William J. McCarthy und Gabor John Kemeny. *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Volume 27 von *Practical Spectroscopy*, Kapitel 5. Fourier Transform Spectrophotometers in the Near-Infrared, Seiten 71–90. Marcel Dekker, 2. Auflage, 2001. ISBN 0-8247-0534-3.
- David L. Nelson und Michael M. Cox. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, 4. Auflage, 2004. ISBN 978-0716762034.
- Frank Peters. *Femtosekunden zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie zur vergleichenden Untersuchung von trans-cis-Isomerisierungs-Reaktionen in Halorhodopsin und Bakteriorhodopsin*. Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Physik, 2005.
- Robin Rammelsberg. *Untersuchung der Protonentransfer-Reaktionen in Bakteriorhodopsin mittels zeitauflösender Step-Scan FTIR-Spektroskopie*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Physik und Astronomie, 1999.
- Peter H. Raven und George B. Johnson. *Biology*. McGraw-Hill, 6. Auflage, 2001. ISBN 978-0073031200.
- Steven O. Smith, Mark S. Braiman, Anne B. Myers, Johannes A. Pardoen, Jacques M. L. Courtin, Chris Winkel, Johan Lugtenburg, und Richard A. Mathies. Vibrational analysis of the all-trans-retinal chromophore in light-adapted bacteriorhodopsin. *Journal of the American Chemical Society*, 109(10):3108–3125, 1987. DOI: 10.1021/ja00244a038.
- James Terner, Alan Compion, und M. A. El-Sayed. Time-resolved resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin on the millisecond timescale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5212–5216, 1977.
- E.L. Terpigov und O.V. Degtyareva. Infrared emission from photoexcited bacteriorhodopsin: studies by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 565–566:287–292, 2001. DOI: 10.1016/S0022-2860(00)00901-7.
- Wikipedia. Protein — Wikipedia, Die freie Enzyklopädie, 2009. URL <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Protein&oldid=66925676>. [Online; Stand 17. November 2009].

Liste der Versionen

Version	Datum	Bearbeiter	Bemerkung
0.9	18.11.2009	Kat/Krä	Versuchsdurchführung
1.0	02.12.2009	Kat/Krä	Versuchsauswertung
1.1	15.01.2010	Krä	Korrekturen