

# Blitzlichtspektroskopie an Bacteriorhodopsin

---

Dr. Jürgen Maurer, Hans-Werner Müller, Dr. Georg Wille, Prof. Dr. Werner Mäntele

## 1 Einleitung

### 1.1 Struktur von Bacteriorhodopsin

Halobakterien sind eine Gruppe von Archaeen, die in extrem salzhaltigem Milieu leben. In der Zellmembran von *Halobacterium salinarum* finden sich als Purpurmembraan bezeichnete Bereiche, die nur ein einziges Protein enthalten: das Bacteriorhodopsin (BR). BR ist ein integrales Membranprotein, das aus 248 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 27,1 kDa aufweist. Es fungiert als lichtgetriebene Pumpe, die Protonen von der zytoplasmatischen Seite durch die Membran zur extrazellulären Seite transportiert. Der so entstehende Protonengradient dient der ebenfalls in der Membran gebundenen ATPase zur ATP-Synthese.

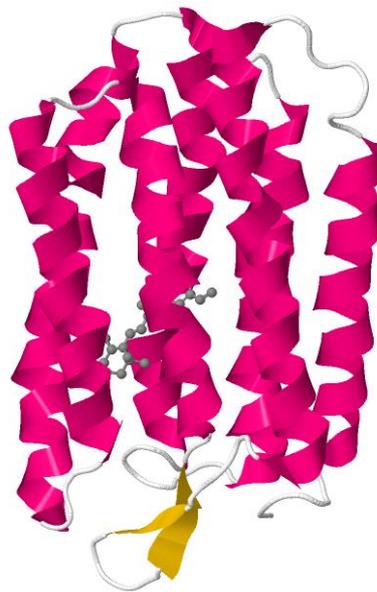


Abbildung 1: Kristallstruktur von BR (PDB: 1FBB)

Innerhalb der Purpurmembraan liegt BR in Form eines zweidimensionalen hexagonalen Gitters aus BR-Trimeren vor, was zu einer außerordentlichen Stabilität der Membran führt. BR ist innerhalb der Membran so orientiert, dass das carboxyterminale Ende auf der zytoplasmatischen Seite liegt, während der N-Terminus zur extrazellulären Seite zeigt. Die Sekundärstruktur des membrangebundenen BR zeigt sieben  $\alpha$ -Helices, die nahezu ringförmig und parallel zueinander angeordnet sind (Abbildung 1). Innerhalb der so gebildeten Pore

befindet sich das Chromophor des Moleküls: ein Retinal, das über eine Schiff'sche Base kovalent an die Aminosäure Lys216 gebunden ist. Das Absorptionsmaximum des isolierten Retinals bei etwa 370 nm verschiebt sich durch den Einbau in das Molekül zu etwa 570 nm. Dieser sogenannte Opsin-Shift gibt dem BR die charakteristische violette Farbe (Kardinalspurpur).

BR ist seit seiner Entdeckung im Jahr 1971 [1] aufgrund der leichten Verfügbarkeit und der hohen Stabilität ein Modellobjekt für die Untersuchung von Retinalproteinen und der biologischen Photochemie geworden. Dank zahlreicher biophysikalischer Methoden sind Struktur und Funktion von BR bereits sehr gut aufgeklärt. Seit einiger Zeit wird intensiv an den Möglichkeiten geforscht, BR z. B. in der optischen Datenverarbeitung (als Speicher oder Schaltelement) oder in der Sicherheitstechnik zu verwenden [2].

## 1.2 Photozyklus und Protonentransport

Das Pumpen von Protonen wird durch das Durchlaufen eines mehrstufigen Photozyklus ermöglicht, der (vereinfacht) als eine lineare Abfolge von Zwischenprodukten beschrieben werden kann (siehe Abbildung 2). Jedes dieser Zwischenprodukte nach der initialen Photoanregung wird durch thermische Relaxationen erreicht und besitzt unterschiedliche Absorptionseigenschaften. Daher können sie mit Hilfe geeigneter Detektionsverfahren, z.B. der zeitaufgelösten Blitzlichtspektroskopie, untersucht werden.

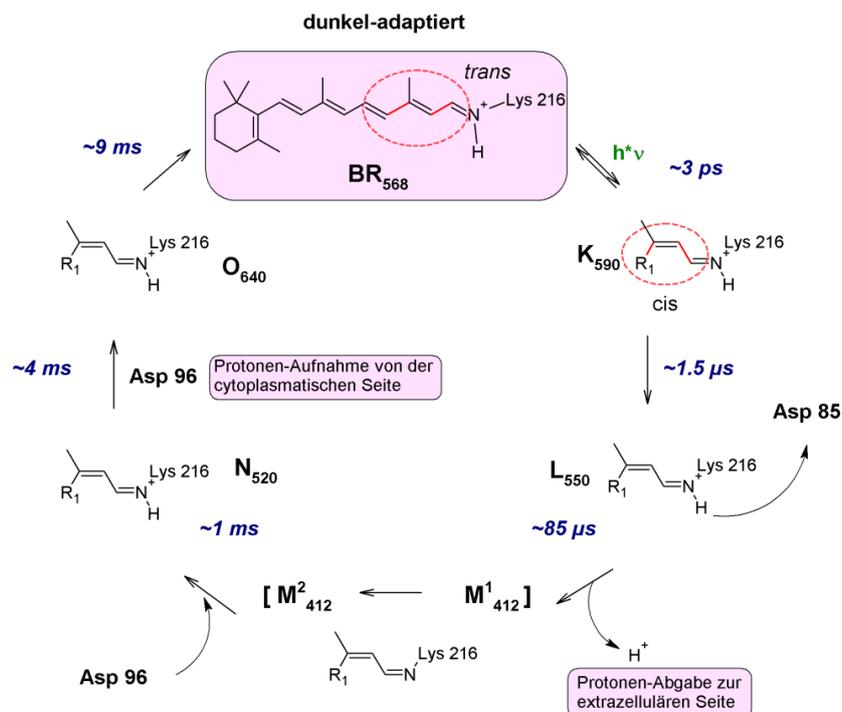


Abbildung 2: Vereinfachter Photozyklus von BR [3]. Die Indizes der Intermediate deuten auf das jeweilige Absorptionsmaximum hin, die Zeiten geben an, mit welchen Zeitkonstanten die jeweiligen Intermediate entstehen bzw. zerfallen. Zu beachten dabei ist, dass die einzelnen Weg und Zeitkonstanten pH-abhängig und innerhalb des Photozyklus weitere Nebenreaktionen möglich sind.

Der Protonentransport selbst resultiert aus Konformationsänderungen des Proteins, die wiederum ihre Ursache in der Wechselwirkung des Retinals mit benachbarten Aminosäuregruppen haben. Den Anfang des Photozyklus stellt die Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von etwa 570 nm durch das Retinal dar. Hierdurch wird eine erste Konformationsänderung des Retinals von *all-trans* zu *13-cis* hervorgerufen, die zum K<sub>590</sub>-Intermediat führt. Über eine Wechselwirkung zwischen Schiff'scher Base und der als Protonenakzeptor dienenden Aminosäure Asp85 wird das Intermediat L<sub>550</sub> erreicht. Nun gibt die Schiff'sche Base ein Proton an Asp85 ab. Dies wäre ohne die zuvor abgelaufene Isomerisierung des Retinals nicht möglich gewesen, da die Schiff'sche Base im Grundzustand einen pK<sub>s</sub>-Wert von über 13 aufweist, somit unter physiologischen Bedingungen also protoniert vorliegt. Bei Asp85 hingegen ist pK<sub>s</sub>≈3, liegt also deprotoniert vor. Durch die lichtinduzierte Retinal-Isomerisierung wird jedoch der pK<sub>s</sub>-Wert der Schiff'schen Base kleiner als der von Asp85, weshalb ein Protonenübertrag überhaupt erst ermöglicht wird.

Die Deprotonierung der Schiff'schen Base führt zu M<sub>412</sub> und so zu einer außerordentlichen Konformationsänderung des gesamten Moleküls, die zu einer Öffnung des Proteins zur extrazellulären Matrix hin führt und so überhaupt den Transport von Protonen von der einen zur anderen Seite ermöglicht. Mit dem Übergang vom L<sub>550</sub>- zum M<sub>412</sub>-Intermediat wird ein Proton an die extrazelluläre Membranoberfläche abgegeben. Nun muss, damit der Protonentransport vektoriell ablaufen kann, verhindert werden, dass ein Proton zurücktransportiert wird. Dies wird durch die Konformationsänderung von M<sup>1</sup><sub>412</sub> nach M<sup>2</sup><sub>412</sub> realisiert, da hierdurch die Zugänglichkeit der Schiff'schen Base für Protonen so geändert wird, dass eine Reprotonierung nun nicht mehr von der extrazellulären, sondern nur noch von der cytoplasmatischen Seite aus möglich ist.

M<sub>412</sub> ist innerhalb des Photozyklus das einzige Intermediat, bei dem die Schiff'sche Base in deprotonierter Form vorliegt. Deshalb ist in diesem Zustand das Absorptionsspektrum stark blauverschoben und M<sub>412</sub> so spektroskopisch leicht zu beobachten.

Das N<sub>520</sub>-Intermediat wird durch die Reprotonierung der Schiff'schen Base erreicht, indem ein Proton von der Aminosäure Asp96 aufgenommen wird. Mit der Reprotonierung von Asp96 durch Aufnahme eines Protons von der cytoplasmatischen Seite und des Erreichens des O<sub>640</sub>-Intermediats ist der Protonentransport zur extrazellulären Seite abgeschlossen. Nun erfolgt eine Re-Isomerisierung des Retinals in die *all-trans*-Konfiguration, wodurch der Ausgangszustand erreicht wird und der Photozyklus erneut ablaufen kann.

### 1.3 Elektronische Übergänge

Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen und Molekülen führt bei der Absorption im Bereich des UV- und sichtbaren Lichtes zur Anregung von Elektronen, im Allgemeinen von Valenzelektronen. Trifft Licht mit geeigneter Frequenz  $\nu$  auf ein Molekül im Grundzustand, kann Absorption erfolgen und das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand angehoben werden. Die Rückkehr in den Grundzustand kann durch spontane bzw. stimulierte Emission erfolgen. Das Wort "kann" drückt dabei Übergangswahrscheinlichkeiten für die beiden Strahlungsprozesse Absorption und Emission aus.

Die photophysikalischen Prozesse bei elektronischen Übergängen sind im Jablonski-Termschema zusammengefasst. Vom Grundzustand, hier  $S_0$ , können durch Absorption die höheren Singulett-Zustände  $S_1$ ,  $S_2, \dots$  erreicht werden. Die Rückkehr zu  $S_0$  kann von  $S_1$  und von höheren Singulett-Zuständen  $S_n$  aus durch Emission von Strahlung (Fluoreszenz) oder durch strahlungslose Desaktivierung (internal conversion, IC) erfolgen. Meist erfolgt zunächst eine strahlungslose Relaxation in den Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  bevor ein Fluoreszenzphoton emittiert werden kann. Strahlungslose Spin-Umkehrprozesse führen zu Triplett-Zuständen  $T_n$  (Intersystem crossing, ISC), die entgegen dem Spin-Verbot durch Strahlungsemission (Phosphoreszenz) oder durch erneutes Intersystem crossing nach  $S_0$  zurückkehren können.

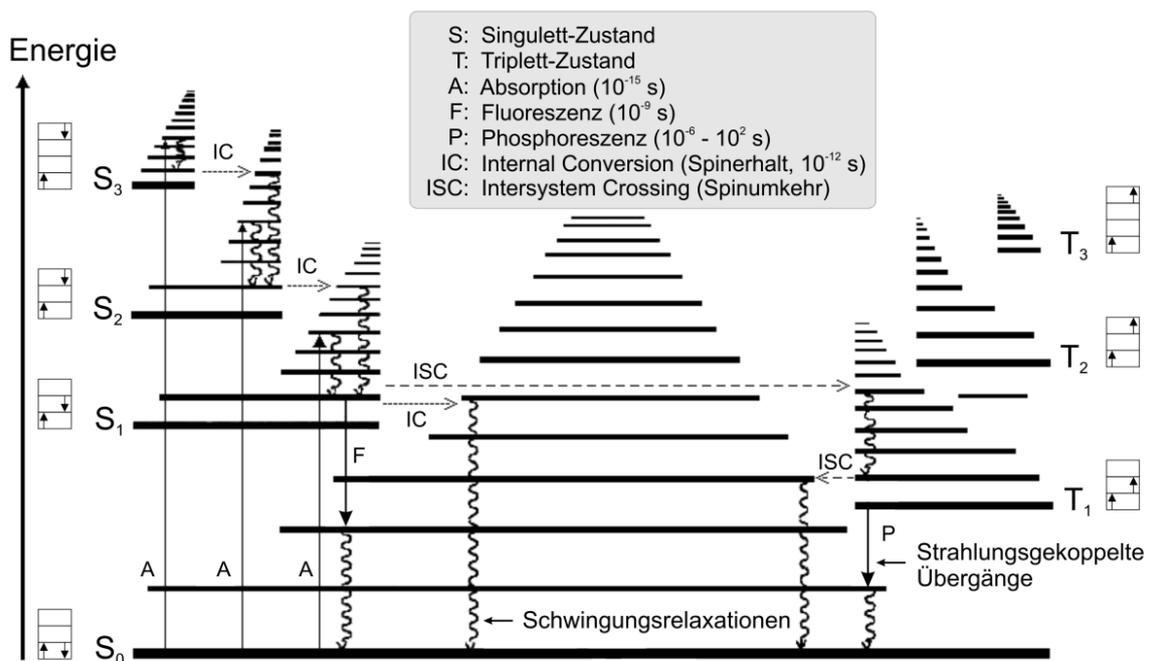


Abbildung 3: Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung von strahlungslosen und strahlungsgekoppelten Übergängen (nach [4])

## 1.4 Lichtabsorption und Spektrum

Fällt ein Lichtstrahl der Intensität  $I_0$  auf ein homogenes, isotropes Medium der Schichtdicke  $d$ , dann kann er, abgesehen von Reflexions- und Strahlungsverlusten, durch Absorption geschwächt werden. Für die Intensität des austretenden Strahls gilt dann  $I = I_0 - I_{Abs}$ .

Aus dem differentiellen Ansatz  $dI = -\alpha \cdot I \cdot dx$  für die Abnahme der Intensität  $dI$  im Schichtdickenbereich  $dx$  erhält man durch Integration:  $I = I_0 \cdot e^{-\alpha \cdot c \cdot d}$  mit  $\alpha$  als substanzspezifischem Absorptionskoeffizienten. Für Lösungen, bei denen ausschließlich der gelöste Stoff der Konzentration  $c$  absorbiert, gilt:

$$\ln \frac{I_0}{I} = \alpha \cdot c \cdot d$$

Daraus folgt mit  $\varepsilon = \ln 10 \cdot \alpha$  das Lambert-Beersche Gesetz:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$A$  : Absorption (optische Dichte, dimensionslos),  $c$  : Konzentration [mol/L],  $\alpha$ : molarer Extinktionskoeffizient [L/(cm·mol)] (korrekterweise sollte man eigentlich vom Absorptionskoeffizienten sprechen, dies hat sich aber bisher nicht durchgesetzt).

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt streng genommen nur für paralleles, monochromatisches Licht und verdünnte, homogene Proben. Bestimmt man für alle Wellenlängen  $\lambda$  die Extinktion und daraus die substanzspezifische Größe  $\varepsilon$ , erhält man eine Absorptionskurve  $\varepsilon(\lambda)$  und damit ein Absorptionsspektrum.

Eine Klassifizierung der elektronischen Übergänge lässt sich mit Hilfe der beteiligten Molekülorbitale vornehmen. Aus besetzten bindenden  $\sigma$ - oder  $\pi$ -Orbitalen oder aus nichtbindenden  $n$ -Orbitalen (einsame Elektronenpaare) kann ein Elektron in die leeren antibindenden  $\sigma^*$ - oder  $\pi^*$ -Orbitale angehoben werden. Entsprechend werden die elektronischen Übergänge (Banden im Absorptionsspektrum) kurz als  $\sigma\sigma^*$ ,  $\pi\pi^*$ ,  $n\pi^*$ ,  $n\sigma^*$  bezeichnet.

Die Lage der Absorptionsbanden hängt von der Natur des elektronischen Übergangs ab. Die  $\sigma\sigma^*$ - und  $\pi\sigma^*$ -Übergänge sind sehr energiereich, sie spielen in vivo bei photosynthetischen Vorgängen und auch in der VIS-Absorptionsspektroskopie keine Rolle, während  $n\pi^*$ - und  $\pi\pi^*$ -Übergänge für die Photochemie der Pigmente in vivo und in vitro verantwortlich sind.

Im elektronischen Grundzustand  $S_0$  ist praktisch ausschließlich das unterste Schwingungsniveau besetzt ( $v = 0$ ). Beim Übergang nach  $S_1$  erreicht man verschiedene höhere Schwingungsniveaus  $v = 1, 2, 3, \dots$  mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit (Franck-Condon-

Prinzip). Dies führt zu einer Feinstruktur im Spektrum des elektronischen Übergangs, die sich bei Raumtemperatur meist in einer Verbreiterung der Absorptionsbande äußert.

### 1.5 Spektroskopische Eigenschaften von Bacteriorhodopsin

Wie bereits beschrieben, zeichnen sich die verschiedenen Intermediate des Photozyklus durch unterschiedliche Absorptionsmaxima aus und können (mit genügend schnellen Methoden) spektroskopisch leicht voneinander unterschieden werden. Abbildung 4 zeigt die Absorptionsspektren sowie die Zeitskalen der einzelnen Intermediate bei zwei unterschiedlichen pH-Werten.

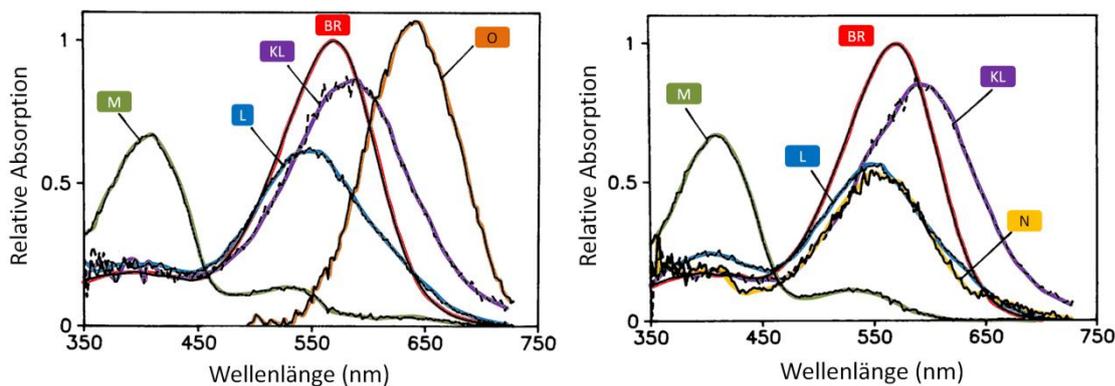


Abbildung 4: Absorptionsspektren der Intermediate bei pH=3,5 (links) und bei pH=6 (rechts, jeweils relativ gegenüber dem Spektrum von BR). Nach [5].

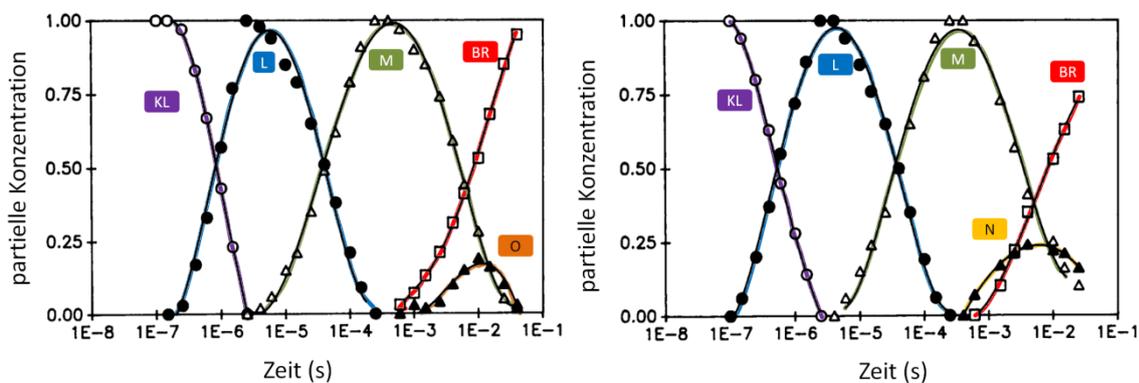


Abbildung 5: Zeitskalen der Intermediate bei pH=3,5 (links) und bei pH=6. Nach [5].

Hieran sieht man, dass mit - wie der im Versuch vorhandenen - „langsameren“ Methoden, die lediglich eine Zeitauflösung im Millisekunden-Bereich liefern, nur die M-, O- und BR-Intermediate messbar sind.

Die Kinetiken der einzelnen Intermediate lassen sich verfolgen, indem beim jeweiligen Absorptionsmaximum (oder bei einer beliebigen anderen Wellenlänge, bei der möglichst nur das zu beobachtende Intermediat absorbiert) die zeitliche Absorptionsänderung nach dem Einblitzen auf die Probe detektiert wird. Abbildung 6 zeigt als Beispiel die Blitzlicht-induzierten Absorptionsänderungen der Intermediate  $M_{412}$ ,  $BR_{568}$  und  $O_{640}$ .

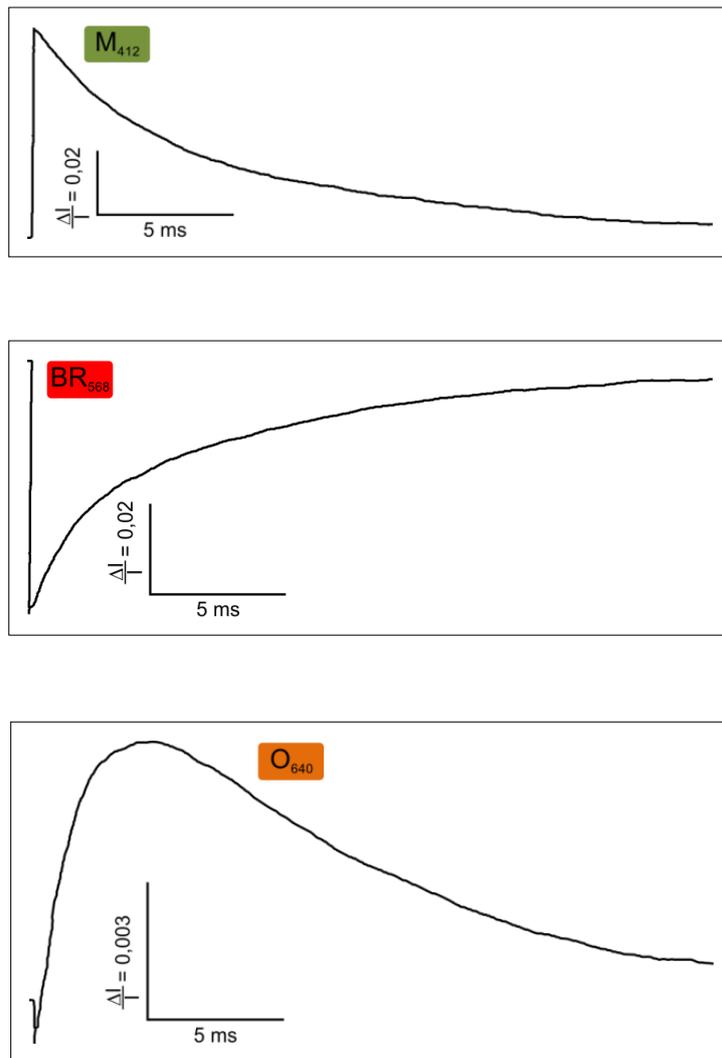
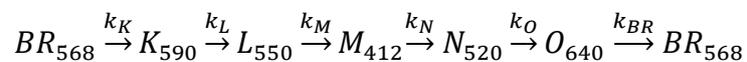


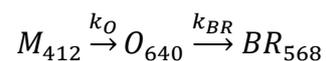
Abbildung 6: Blitzlicht-induzierte Absorptionsänderungen der Intermediate  $M_{412}$ ,  $BR_{568}$  und  $O_{640}$  (nach [6])

## 1.6 Reaktionskinetik

Der gesamte Photozyklus von BR kann (wiederum vereinfacht und ohne Berücksichtigung von Zwischenreaktionen) durch die Folgereaktion



beschrieben werden. Jedoch ist in diesem Versuch lediglich die Untersuchung des Weges



möglich, weil die übrigen Übergänge zu schnell für die Zeitauflösung des vorhandenen Blitzlichtspektrometers sind. Diese sogenannte Folgereaktion kann als eine Abfolge von zwei Reaktionen 1. Ordnung beschrieben werden.

Die erste Reaktion betrifft die Umwandlung von  $M_{412}$  nach  $O_{640}$ . Das entsprechende Geschwindigkeitsgesetz wird beschrieben durch:

$$\frac{d[M_{412}]}{dt} = -k_O \cdot [M_{412}] \quad (1)$$

Das  $O_{640}$ -Intermediat wird aus  $M_{412}$  gebildet und zerfällt gleichzeitig zu  $BR_{568}$ . Das zugehörige Gesetz hierfür lautet:

$$\frac{d[O_{640}]}{dt} = k_O \cdot [M_{412}] - k_{BR} \cdot [O_{640}] \quad (2)$$

Die Bildung von  $BR_{568}$  wird wiederum beschrieben durch:

$$\frac{d[BR_{568}]}{dt} = k_{BR} \cdot [O_{640}] \quad (3)$$

Insgesamt muss die Summe aller Konzentrationen konstant sein, nämlich:

$$[M_{412}] + [O_{640}] + [BR_{568}] = a_0 \quad (4)$$

Aus der Integration der Gleichungen (1) bis (3) werden so die Konzentration-Zeit-Gesetze für die Intermediate  $M_{412}$ ,  $O_{640}$  und  $BR_{568}$  erhalten:

$$[M_{412}] = a_0 \cdot e^{-k_O \cdot t}$$

$$[O_{640}] = a_0 \cdot k_O \cdot \frac{e^{-k_O \cdot t} - e^{-k_{BR} \cdot t}}{k_{BR} - k_O}$$

$$[BR_{568}] = a_0 \cdot \left( 1 + \frac{k_O \cdot e^{-k_{BR} \cdot t} - k_{BR} \cdot e^{-k_O \cdot t}}{k_{BR} - k_O} \right)$$

Den graphischen Verlauf dieser drei Konzentration-Zeit-Gesetze gibt Abbildung 7 für die Fälle  $k_O > k_{BR}$  bzw.  $k_O < k_{BR}$  wieder. Je größer  $k_O$  im Vergleich  $k_{BR}$  ist, desto mehr baut sich vom Zwischenprodukt  $O_{640}$  auf.

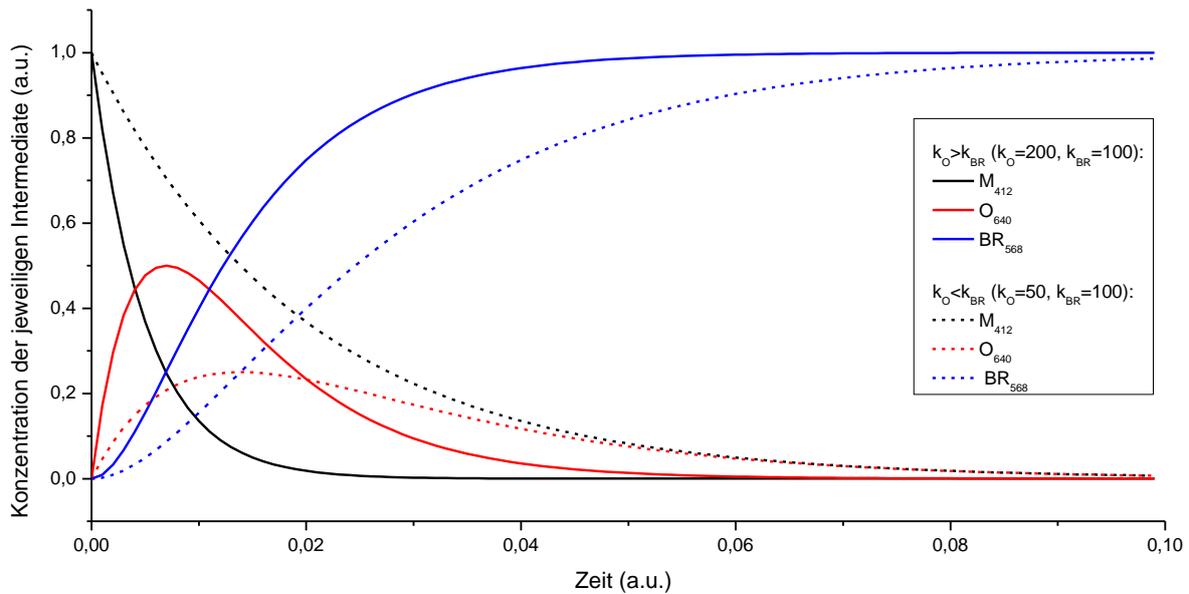


Abbildung 7: Konzentration-Zeit-Kurven einer Folgereaktion für die Fälle  $k_O > k_{BR}$  ( $k_O=200$ ,  $k_{BR}=100$ ; durchgezogene Linien) und für  $k_O < k_{BR}$  ( $k_O=50$ ,  $k_{BR}=100$ ; gestrichelte Linien).

## 2 Vorbereitung

- Elektromagnetisches Spektrum (UV-VIS, nahes Infrarot)
- Absorption, Lambert-Beersches Gesetz, Absorptionsspektrum
- Reaktionskinetik (Reaktion erster Ordnung, Folgereaktion), Zeitkonstante, Halbwertszeit
- Bacteriorhodopsin
- 

## 3 Versuchsaufbau

Eine gebräuchliche Messmethode zur Erfassung kurzzeitiger spektraler Änderungen ist die Blitzlichtphotometrie. In den durchzuführenden Experimenten wird sie zur Messung der Absorptionsänderungen, die beim Durchlaufen des Photozyklus stattfinden, verwendet. Mit der verwendeten Apparatur sind allerdings die sehr schnellen Vorgänge, etwa die Bildung des K- und des L-Intermediates mit Halbwertszeiten im Piko- und Sub-Mikrosekundenbereich, nicht messbar. Beobachtet werden können jedoch die „langsamen“ Prozesse wie das Entstehen und Zerfallen des O-Intermediates, das Zerfallen des M-Intermediates und die Regeneration von BR<sub>568</sub>.

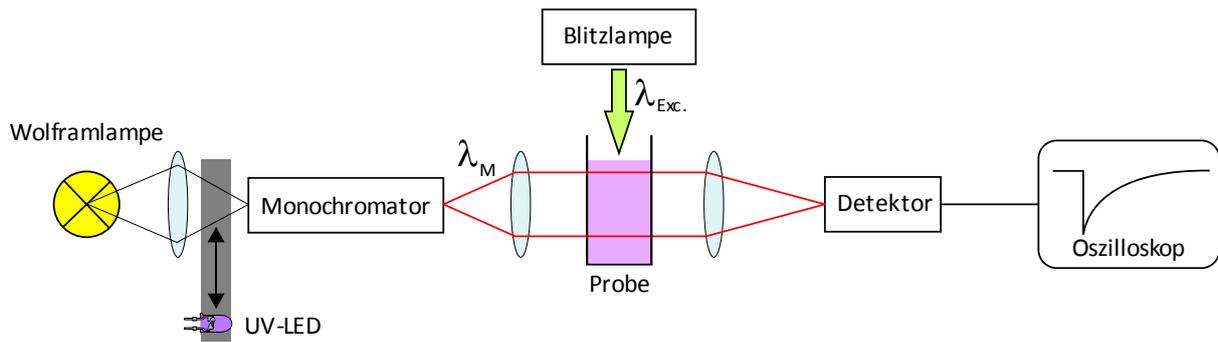


Abbildung 8: Versuchsaufbau

Licht von einer Wolframlampe oder von einer Leuchtdiode (LED) wird in einem Monochromator spektral zerlegt ( $\lambda_M$ ) und auf die Probe abgebildet. Der Anteil, der die Probe durchsetzt ( $I_1$ ), wird in einem Detektor in eine elektrische Spannung umgewandelt, die der Lichtintensität proportional ist. Mit einer kurzen, intensiven Zusatzbeleuchtung (Laserblitz, Fotoblitz o.ä.) bei einer geeigneten Anregungswellenlänge  $\lambda_{Exc}$  wird der Photozyklus induziert. Die durch ihn hervorgerufenen Absorptionsänderungen  $\Delta A$  werden bei der Messlichtwellenlänge  $\lambda_M$  als Intensitätsänderungen  $\Delta I$  vom Detektor registriert. Durch optische Filter können Anregungs- und Messlichtwellenlänge voneinander getrennt werden, so dass der Detektor kein Anregungslicht registriert. Das Detektorsignal wird verstärkt und mit einem Speicheroszilloskop aufgezeichnet. Für kleine Intensitätsänderungen  $\Delta I$  besteht ein linearer Zusammenhang zur Absorptions- ( $\Delta A$ ) bzw. Konzentrationsänderung  $\Delta c$ , d.h.  $\Delta I \sim \Delta A \sim \Delta c$ , wobei  $\Delta c$  die durch die Zusatzbelichtung erzeugte Konzentrationsänderung ist.

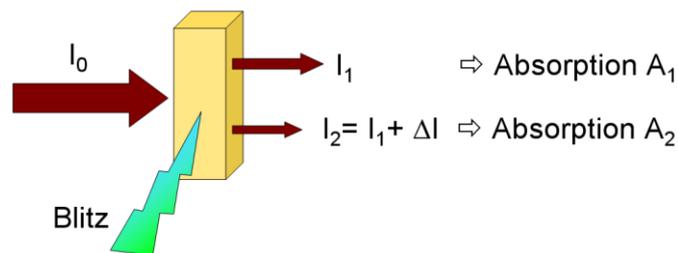


Abbildung 9: Prinzip der Messung

## 4 Versuchsdurchführung

Für die Messungen stehen Ihnen aliquotierte Proben von Bacteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* zur Verfügung. Stellen Sie zunächst drei verdünnte Lösungen (Endvolumen: ca. 1ml) von BR her bei pH = 3,5, pH = 6 und pH = 8,5.

Die für die Verdünnung benötigten Lösungen (1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) stehen Ihnen bereits zur Verfügung.

### 4.1 Messung der Absorptionsspektren der drei BR-Proben

- Einkanal-Messung (Probe und Puffer jeweils gegen Luft messen)
- Zweikanal-Messung (Puffer jeweils als Referenz verwenden)

Sie erhalten aus diesen insgesamt sieben Messungen je zwei Absorptionsspektren für jede Probe. Bestimmen Sie anschließend mit  $\epsilon_{568\text{ nm}} = 6,3 \cdot 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$  für alle drei Proben die (mittlere) BR-Konzentration. Notieren Sie sich die Positionen der Absorptionsmaxima.

### 4.2 Ermittlung der Intensitätskurven der beiden Lichtquellen

Ermitteln Sie im Bereich von 350 – 650 nm in Schritten von 10 nm die Intensitäten der beiden Lichtquellen. Im Fall der LED benutzen Sie im Bereich von 380 – 420 nm Schritte von 5 nm.

### 4.3 Ermittlung von Differenzabsorptionsspektren

Legen Sie für jede Probe eine Tabelle in folgender Form an:

Wellenlänge $\lambda$ (nm)	Intensität $I_1$ (V)	maximale Intensitätsänderung $\Delta I$ (V)	Absorptions- änderung $\Delta A$
350			
360			
⋮			
650			

Bestimmen Sie für alle drei Proben im Bereich von 350 – 650 nm die vor dem Blitzen durch die Probe hindurchtretende Intensität  $I_1$  und die nach dem Blitzen entstehende maximale Intensitätsänderung  $\Delta I$ . Verwenden Sie dabei jeweils die Lichtquelle, die in dem relevanten Wellenlängenbereich die höhere Intensität liefert (im Versuchsteil 4.2 ermittelt).

Berechnen Sie aus den beiden ermittelten Werten die Differenz-Absorptions-Werte  $\Delta A$  und tragen Sie diese graphisch gegen die Wellenlänge auf. Lesen Sie in diesem Differenz-Absorptionsspektrum die Wellenlängen ab, bei denen die Intermediate M<sub>412</sub> und BR<sub>568</sub> die maximale Absorptionsänderung aufweisen.

**!** *Machen Sie sich vor Antritt des Versuchs klar, wie Sie aus  $I_1$  und  $\Delta I$  die Absorptionsänderung bestimmen können (siehe auch Abbildung 9)!*

#### 4.4 Auswertung der Reaktionskinetiken und Bestimmung der Halbwertszeiten

Ermitteln Sie bei den jeweils ermittelten Wellenlängen der maximalen Absorptionsänderung die Intensität  $I_1$  vor dem Blitzen und nehmen Sie anschließend die Kinetiken der Absorptionsänderung nach Auslösen des Blitzes auf. Zusätzlich nehmen Sie noch jeweils eine Kinetik bei 640 nm und bei 700 nm auf, um das O-Intermediat zu beobachten.

**?** *Warum ist es sinnvoll, das O-Intermediat zusätzlich bei 700 nm zu beobachten und nicht nur bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums?*

Rechnen Sie nun die gemessenen, zeitabhängigen Intensitätsänderungen in die entsprechenden Absorptionsänderungen um. Passen Sie die so erhaltenen Absorptionsänderungs-Kinetiken mit den jeweiligen, in Kapitel 1.6 genannten, Funktionen an. Bestimmen Sie daraus die mittleren Geschwindigkeitskonstanten  $k_O$  und  $k_{BR}$  und die mittleren Halbwertszeiten  $t_O$  und  $t_{BR}$ .

**Diskutieren Sie die Ergebnisse!**

## 5 Literatur

- [1] D. Oesterhelt und W. Stoeckenius, „Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium“, *Nature. New Biol.*, Bd. 233, Nr. 39, S. 149–152, Sep. 1971.
- [2] N. Hampf, „Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories“, *Chem. Rev.*, Bd. 100, Nr. 5, S. 1755–1776, Mai 2000.
- [3] G. Schäfer, „Charakterisierung der Photoreaktion der lichtgetriebenen Protonenpumpe Proteorhodopsin mit IR-Spektroskopie und die Entwicklung einer Methodik zur Untersuchung von Carboxylierungsreaktionen am Beispiel von RuBisCO“, Frankfurt a.M., 2009.
- [4] D. Wöhrle, M. W. Tausch, und W.-D. Stohrer, *Photochemie: Konzepte, Methoden, Experimente*, 1. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1998.
- [5] G. Váró und J. K. Lanyi, „Photoreactions of bacteriorhodopsin at acid pH“, *Biophys. J.*, Bd. 56, Nr. 6, S. 1143–1151, 1989.
- [6] M. Renard und M. Delmelle, „pH and salt effects on the slow intermediates of the bacteriorhodopsin photocycle“, *Eur. Biophys. J.*, Bd. 12, Nr. 4, S. 223–228, Sep. 1985.