

Abbildung 49: Experimentelle Ergebnisse der Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie im Bereich der Ethenbande des Bakteriorhodopsins. Die Kinetik bei 1498 cm^{-1} unterscheidet sich insofern von den restlichen, als nur eine Nullpunktskorrektur, aber keine Amplitudenkorrektur durchgeführt wurde. Bei den eingezeichneten Linien handelt es sich um Interpolationen in Form einer Summe von e-Funktionen, die mit dem Anregungs- und "gate"-Puls geeignet gefaltet wurden. Siehe hierzu Kapitel 2.3.5.

4 Experimentelle Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die experimentellen Ergebnisse

4.1.1 Die zeitabhängigen Kinetiken

Mit der Ethylenbande bezeichnet man die symmetrische Streckschwingung der C-C-Doppelbindungen des Chromophors. Die Bandenposition ist mit dem Grad der π -Elektronen-Delokalisierung entlang der Doppelbindungen verknüpft.¹⁴⁹ Die Isomerisierung des Chromophors nach optischer Anregung verändert die Wechselwirkung des π -Elektronensystems mit der polaren Umgebung und damit indirekt auch die Bandenposition. Die Ethylenbande kann deshalb als Sonde betrachtet werden, mit deren Hilfe der Isomerisierungsprozeß verfolgt werden kann.

Abbildung 49 zeigt zeitabhängige Absorptionsänderungen (=Kinetiken) im Spektralbereich der Ethylenbande des Bakteriorhodopsins nach optischer Anregung bei 540 nm in einem zeitlichen Bereich, der die ersten Intermediate des Fotozyklus umfaßt. Eine negative (positive) Absorptionsänderung, auch Bleichsignal (Absorptionssignal) genannt, führt zu einer erhöhten (verminderten) Transmission des Probestrahles, dessen Wellenzahl mit einer Genauigkeit von $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ bei jeder Kinetik vermerkt ist. Die eingezeichneten Linien stellen eine Simulation einer geeigneten Faltung einer Summe von Exponentialfunktionen mit Anregungs- und "gate"-Puls dar.¹⁵⁰ Sie sind im Sinne einer Interpolation aufzufassen.

Die dargestellten Zeitverläufe lassen sich in vier Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe ($1502 \text{ cm}^{-1} - 1515 \text{ cm}^{-1}$) finden sich rein absorptive Signale, mit zwei noch zu erklärenden Charakteristika. Einerseits ist der scheinbare Nullpunkt¹⁵¹ verschoben und andererseits bildet sich nach wenigen Pikosekunden ein Maximum, gefolgt von einem Rückgang der Absorption, aus.

Die zweite Gruppe ($1526 \text{ cm}^{-1} - 1536 \text{ cm}^{-1}$), die von der ersten durch einen Übergangsbereich getrennt wird, beinhaltet reine Bleichsignale, die mit einem starken Rückgang der Amplitude zu späteren Zeiten verbunden sind. Das Bleichsignal bei 1529 cm^{-1} zeigt des weiteren eine zeitliche Feinstruktur in Form eines zusätzlichen Bleichsignales, die man auch in der Kinetik bei 1526 cm^{-1} zu sehen glaubt.

Der Übergangsbereich wird beispielhaft durch die Kinetik bei 1519 cm^{-1} vertreten und zeigt absorptive Signale und Bleichsignale.

Die vierte Gruppe wird durch die Kinetik bei 1498 cm^{-1} und die nicht gezeigte, aber in ihrer Qualität vergleichbare Kinetik bei 1542 cm^{-1} gebildet. Bei der Datenverarbeitung erfolgte eine Nullpunktkorrektur, aber keine Normierung. Unter Berücksichtigung des Rauschens zeigen beide Kinetiken keine zeitliche Absorptionsänderung. Sie begrenzen also den spektralen Bereich, innerhalb dessen die Ethylenbande ihre Dynamik entfaltet.

¹⁴⁹ Siehe hierzu auch Unterkapitel "Korrelation für die C=C-Bande in Kapitel 2.1.4

¹⁵⁰ Siehe hierzu die Fußnotenbemerkung zu $K(t)$ in Kapitel "2.3.5 Die Simulationsfunktion für Silicium".

¹⁵¹ Mit dem scheinbaren Nullpunkt wird der Zeitpunkt des Wendepunktes der Anstiegsflanke bezeichnet. Dieser Zeitpunkt muß nicht mit dem experimentellen Nullpunkt, der durch den Anregungspuls definiert wird, zusammenfallen.

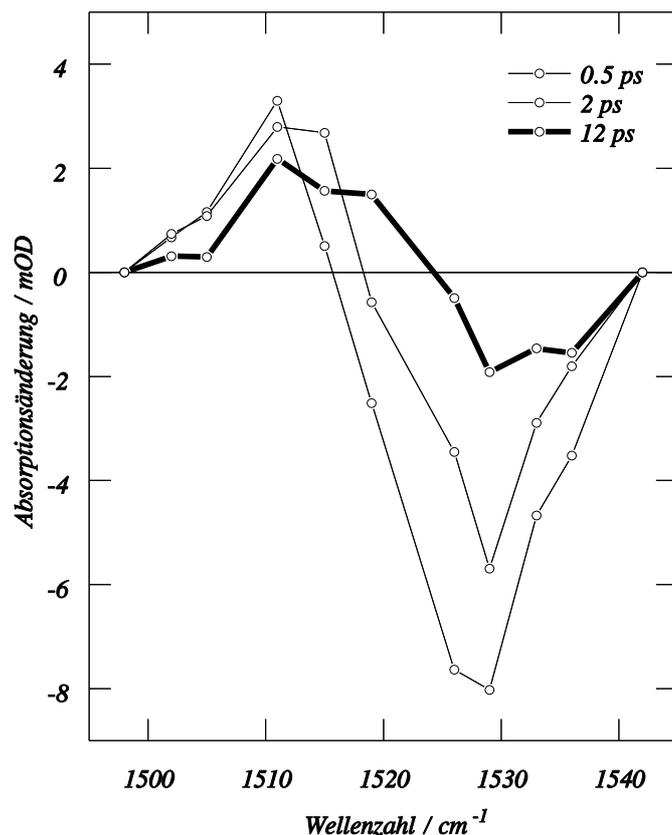


Abbildung 50: Die drei abgeleiteten Spektren zu unterschiedlichen Verzögerungszeiten (0.5 ps, 2 ps, 12 ps) nach optischer Anregung bei 540 nm im Spektralbereich der Ethylenbande des Bakteriorhodopsins. Die Spektren wurden aus den Kinetiken der Abbildung 49 und der eingezeichneten Interpolation gewonnen. Nachdem im Rahmen des Systemrauschens die Kinetiken bei 1498 cm⁻¹ und bei 1542 cm⁻¹ (nicht gezeigt) keine zeitliche Struktur erkennen lassen, wurde im Spektrum die Absorptionsänderung an diesen spektralen Positionen zeitunabhängig auf Null gesetzt.

4.1.2 Die zeitabhängigen Spektren

Die präsentierten Kinetiken in Abbildung 49 weisen keinen einheitlichen Satz an Verzögerungszeiten auf. Um dennoch aus ihnen zeitabhängige Spektren ableiten zu können, müssen die Meßwerte geeignet interpoliert werden. Es soll deutlich darauf hingewiesen werden, daß diese Methode im allgemeinen einer Informationsfilterung gleichkommt, und deshalb Vorsicht im Hinblick auf eine weitere Interpretation angebracht ist.

Für die Ableitung der zeitabhängigen Spektren (Abbildung 50) wird die in die Kinetiken eingezeichnete Interpolation verwendet. Dadurch können die Spektren nur die zeitliche Grobstruktur mit der in Abbildung 49 gezeigten Genauigkeit widerspiegeln.

Zum Zeitpunkt 0.5 ps sieht man eine absorptive Bande mit einem Bandenschwerpunkt bei 1511 cm⁻¹ und ein Bleichsignal mit einem Bandenschwerpunkt bei 1528 cm⁻¹. In der weiteren zeitlichen Entwicklung nehmen die Bandenmaxima ab und die Bandenschwerpunkte verschieben sich von 1511 cm⁻¹ nach 1513 cm⁻¹ und von 1528 cm⁻¹ nach 1531 cm⁻¹. Diese Entwicklung ist nach ca. 12 ps abgeschlossen.

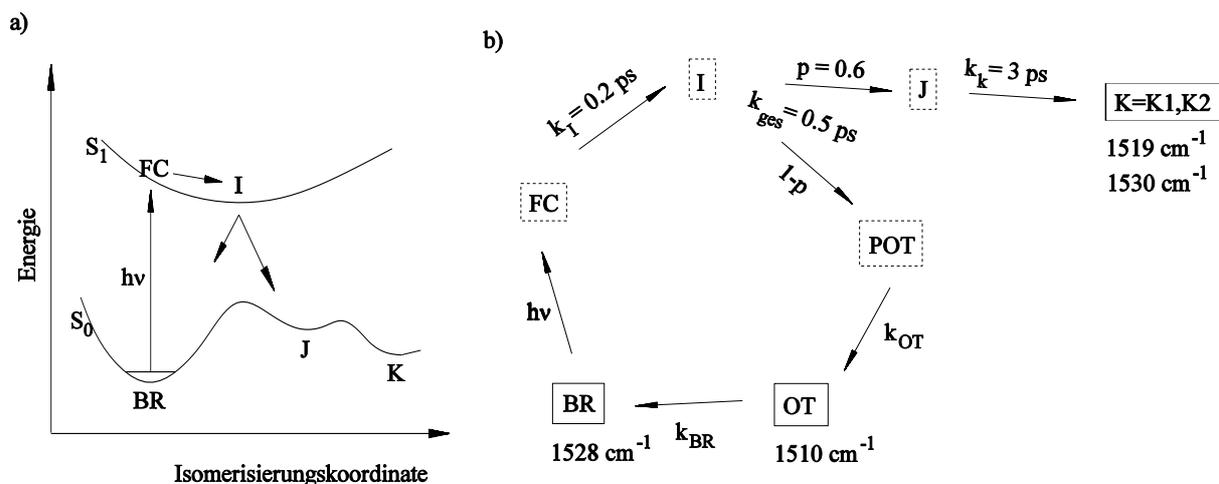


Abbildung 51: Aus dem Potentialmodell (a) nach Zinth/Mathies abgeleitetes Ratenmodell (b), das zur Simulation der vorgestellten experimentellen Kinetiken herangezogen wird. Hervorgehoben werden diejenigen Zustände (BR, OT, $K = K1, K2$), die später mit einer Infrarotbande verknüpft werden. Die entsprechenden Bandenpositionen, Raten und die Quanteneffizienz für die Vorwärtsreaktion von I nach J sind ebenfalls angegeben.

4.2 Die Simulation der Ergebnisse

4.2.1 Das verwendete Modell und seine Parameter

Ultrakurze optische Absorptionsmessungen bilden den Ausgangspunkt für die Modellierung schwingungsangeregter Dynamiken. Im Fall von Bakteriorhodopsin gibt es als Folge sich widersprechender Messungen zwei Potentialmodelle (siehe Tabelle 5), die den Isomerisierungsprozeß auf der Piko- und Subpikosekundenzeitskala beschreiben. Beide Modelle unterscheiden sich in der Zeitkonstante τ_f für das Erreichen des Grundzustandes I der ersten angeregten elektronischen Potentialfläche S_f und in τ_f der folgenden Weiterreaktion, sowie in der Existenz eines J-Intermediates. Es wird sich zeigen, daß τ_f keinen signifikanten Einfluß auf die Simulation der hier vorgestellten Versuchsergebnisse haben wird. Für τ_f werden 0.5 ps angesetzt. Diese Wahl steht in Einklang mit dem Zinth/Mathies-Modell und stellt bezüglich des zweiten Modells (Anfinrud) eine Vereinfachung dar. Mit dieser Festlegung ist auch die Existenz von J, einem Vorläuferzustand von K, verbunden, der aber in der Simulation spektroskopisch nicht direkt in Erscheinung treten wird.

Die Bandenposition der Ethenbande ist mit den unterschiedlichen Intermediaten verknüpft. Die für die Simulation benötigten Bandenpositionen werden aus der Literatur entnommen. Zu BR_{570} gehört die Schwingungsgrundzustandsbande ($\nu=0 \rightarrow \nu=1$), die ihr Absorptionsmaximum bei 1528 cm^{-1} hat. Die schwingungsangeregte Bandenposition ($\nu=1 \rightarrow \nu=2$), die in dieser Arbeit OT-

Modellparameter	Modell 1 = Mathies/Zinth	Modell 2 = Anfinrud
Zeitkonst. für <i>I</i>	200 fs	30 fs
Zeitkonst. Weiterreaktion	0.5 ps	Bereich : 0.37 ps - 2.1 ps
<i>J</i> -Zustand	Ja	Nein

Tabelle 5: Gegenüberstellung der im Hinblick auf die Simulation der vorgestellten Kinetiken wichtigen Unterschiede der beiden Potentialmodelle, die den Isomerisierungsprozeß von Bakteriorhodopsin auf der Piko- und Subpikosekundenzeitskala beschreiben. Mit *I* wird der Grundzustand der ersten angeregten Potentialfläche *S*₁ bezeichnet. Eine detailliertere Diskussion der Modelle ist in Kapitel 2.1.3 zu finden.

Bande genannt wird, läßt sich aus Resonanz-Raman-Messungen entnehmen. Myers et al¹⁵² ordneten vorläufig eine bei 3036 cm⁻¹ liegende Bande dem Obertonübergang ($\nu=0 \rightarrow \nu=2$) des Grundzustandes zu, woraus sich die Position der *OT*-Bande zu 3036 cm⁻¹ - 1527 cm⁻¹ = 1509 cm⁻¹ ableitet. Gestützt wird diese vorläufige Zuordnung durch Subpikosekunden-Resonanz-Raman-Messungen von Van den Berg et al¹⁵³ mit einer Zeitauflösung von 800-900 fs. Sie konnten eine bei 1510 cm⁻¹ liegende Bande nachweisen und ordneten sie einem *K*-Vorläufer zu. Aus zwei Gründen braucht eine mit den elektronisch angeregten Zuständen *FC* und *I* verknüpfte Bandenposition nicht berücksichtigt zu werden. Erstens ist die Zeitauflösung des Subpikosekunden-Absorptionsspektrometers zu gering (0.6 ps) und zweitens verschiebt sich die Position der Ethylenbande nach optischer Anregung in der Größenordnung von 100 cm⁻¹, wie Lochbrennspektroskopie von Bakteriorhodopsin in PVA-Filmen bei tiefen Temperaturen¹⁵⁴ zeigen. Sie befindet sich damit nicht mehr in dem 42 cm⁻¹ breiten Beobachtungsfenster dieser Arbeit. Im *K*-Zustand, der auf der Grundzustandspotentialfläche zu finden ist, teilt sich die Ethylenbande und bildet nach ps-Resonanz-Raman-Messungen¹⁵⁵ und theoretischen Rechnungen¹⁵⁶ eine Doppelbande. Sie werden in dieser Arbeit mit *K1* (1519 cm⁻¹) und *K2* (1530 cm⁻¹) bezeichnet. Proteinbanden könnten auch einen Beitrag zum spektralen Bereich des Beobachtungsfensters liefern. In diesem Modell wird dieser Einfluß aber nicht berücksichtigt.

Im letzten Schritt müssen die zu berücksichtigenden Bandenpositionen mit Zuständen in einem Ratenmodell verknüpft werden. *BR* wird mit dem elektronischen Grundzustand *BR*₅₇₀, *K1* und *K2* mit dem *K*-Intermediat der Grundzustandspotentialfläche verknüpft. Die *OT*-Bande ist als Vorläufer von *BR* anzusehen, weshalb ein neuer Vorläuferzustand *OT* benötigt wird. Damit Freiheit in der Bevölkerung dieses Zustandes besteht, ist ein weiterer Vorläuferzustand - *POT* (precursor of overtone) genannt - notwendig. Damit ergibt sich das in Abbildung 51 b) dargestellte Ratenmodell, das seine mathematische Entsprechung in folgenden Gleichungen findet:

¹⁵² Myers A.B. et al, J. Chem. Phys. **79** (1983), 603

¹⁵³ Van den Berg R. et al, Biophys. J. **58** (1990), 135

¹⁵⁴ Kamalov V.F. et al, J. Phys. Chem. **100** (1996), 2762; PVA = Poly Vinyl-Alkohol

¹⁵⁵ Althaus T. et al, Isr. J. Chem. **35** (1995), 227; Lohrmann R. et al, in Lau et al, *Time-Resolved Vibrational Spectroscopy VI*, Springer Proceedings in Physics **74**, Springer 1994, 208 ff

¹⁵⁶ Grossjean M. et al, J. Phys. Chem. **94** (1990), 8059

ε_{ges}	k_I^{-1}	k_{ges}^{-1}	k_{OT}^{-1}	k_{BR}^{-1}	k_k^{-1}	σ_{PP}	σ_{gate}
0.037	0.2 ps	0.5 ps	0.67 ps	2 ps	3 ps	0.5 ps	0.5 ps

Tabelle 6: Tabelle der verwendeten Raten k_x , der Quanteneffizienz p , der Anregungspulsbreite σ_{PP} und der Gatepulsbreite σ_{gate} . Nur die fett gedruckten Parameter werden in der Simulation variiert. Die Werte ergaben sich durch eine Anpassung nach Augenmaß.

Bande	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\Delta\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\varepsilon/\text{a.u.}$
BR	1528	17	1
OT	1511	17	2
K_1	1519	20	0.7
K_2	1530	20	0.3

Tabelle 7: Zusammenstellung der Bandenparameter. $\tilde{\nu}$ bezeichnet die Bandenposition (Genauigkeit: $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$), deren Breite $\Delta\tilde{\nu}$ beträgt. ε ist der relative Extinktionskoeffizient. In der harmonischen Oszillatornäherung beträgt er 2 für den $\nu=1 \rightarrow \nu=2$ Übergang des BR Grundzustandes. Nur die fett gedruckten Parameter werden in der Simulation variiert. Die Werte ergaben sich durch eine Anpassung nach Augenmaß.

$$\begin{aligned}
d_t N_{BR} &= \frac{\sigma_{BR,FC}}{h\nu} I_{PP}(t) N_{BR} + k_{BR} N_{OT}, & d_t \equiv d/dt \\
d_t N_{BR^*} &= \frac{\sigma_{BR,FC}}{h\nu} I_{PP}(t) N_{BR} - k_I N_{BR^*} \\
d_t N_I &= k_I N_{BR^*} - k_{\text{ges}} N_I \\
d_t N_J &= p k_{\text{ges}} N_I - k_k N_J \\
d_t N_k &= k_k N_J \\
d_t N_{POT} &= (1-p) k_{\text{ges}} N_I - k_{OT} N_{POT} \\
d_t N_{OT} &= k_{OT} N_{POT} - k_{BR} N_{OT}
\end{aligned} \tag{101}$$

Darin bezeichnet $\sigma_{BR,FC}$ den Wirkungsquerschnitt für den elektronischen Übergang $BR_{570} \rightarrow FC$ und $I_{PP}(t)$ den gaußförmig angesetzten Intensitätsverlauf des Pumpimpulses. Auf Grund der kleinen Fluoreszenzquantenausbeute¹⁵⁷ von $5 \cdot 10^{-5}$ kann der mit einer direkten Relaxation verbundene Übergang $FC \rightarrow BR_{570}$ vernachlässigt werden.

Um schließlich zeit- und wellenzahlabhängige Absorptionsänderungen unter Berücksichtigung der Detektionsmethode "optisches gaten" berechnen zu können, müssen die aus dem Ratenmodell

¹⁵⁷ Polland H.J. et al., Biophys. J. **49** (1986), 651

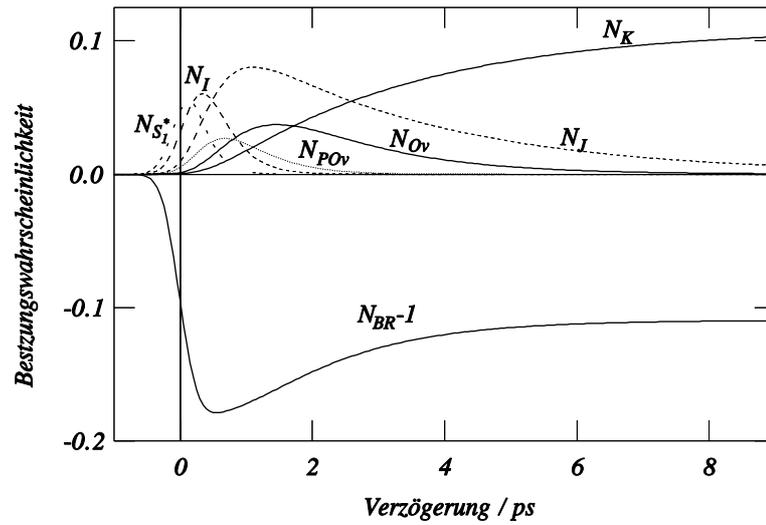


Abbildung 52: Zeitabhängigkeit der im verwendeten Ratenmodell vorkommenden Besetzungswahrscheinlichkeiten. Dicke Linien kennzeichnen die Zustände, die spektroskopisch direkt in Erscheinung treten werden.

abgeleiteten zeitabhängigen Besetzungswahrscheinlichkeiten in Gleichung (69)¹⁵⁸

$$\Delta OD(t, \tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{2}{\sigma_{gate}} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \exp\left(-4 \ln 2 \left(\frac{\tau}{\sigma_{gate}}\right)^2 - \ln 10 \epsilon_{ges} [(N_{BR-1}) L_{BR} + N_K (L_{K1} + L_{K2}) + N_{OT} L_{OT}]\right) d\tau \quad (102)$$

$$L_X \equiv L_{\Delta \tilde{\nu}_X \tilde{\nu}_X \epsilon_X}(\tilde{\nu}) \equiv \frac{\epsilon_X}{1 + \left(2 \frac{\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_X}{\Delta \tilde{\nu}_X}\right)^2}, \quad X = BR, K1, K2, OT$$

eingesetzt werden.

Insgesamt werden 20 Parameter, die Tabelle 6 und 7 zusammenfassen, zur Beschreibung benötigt. Davon sind 15 durch experimentelle Gegebenheiten festgelegt oder der Literatur entnommen worden. Nur die zwei Ratenkonstanten k_{OT} und k_{BR} , die beiden relativen Extinktionskoeffizienten für die K-Doppelbande und der Gesamttextinktionskoeffizient ϵ_{ges} sind als variabel anzusehen. Die mathematische Modellierung weist somit nur 5 Freiheitsgrade auf.

4.2.2 Die Welt des Modells

Abbildung 52 zeigt die zeitabhängigen Besetzungswahrscheinlichkeiten der beteiligten Zustände des angesetzten Ratenmodells unter Verwendung der in Tabelle 6 zusammengefaßten Parameter. Dicke Linien kennzeichnen die Besetzungswahrscheinlichkeiten, die später mit einer Infrarotbande identifiziert werden und dadurch eine direkte spektroskopische Relevanz erhalten.

Als Folge des komplexen Ratenmodells fällt der scheinbare Nullpunkt¹⁵⁹ nur für N_{BR-1} und N_I mit dem wirklichen Nullpunkt zusammen. Die Amplitude von N_{BR-1} spiegelt den zeitlichen Verlauf

¹⁵⁸ Siehe ausführliche Herleitung in Kapitel "2.3.4 Das einfache phänomenologische Modell für Bakteriorhodopsin"

¹⁵⁹ Der scheinbare Nullpunkt ist der Zeitpunkt, der zum Wendepunkt der Anstiegsflanke gehört. Siehe hierzu Kapitel 2.3.2

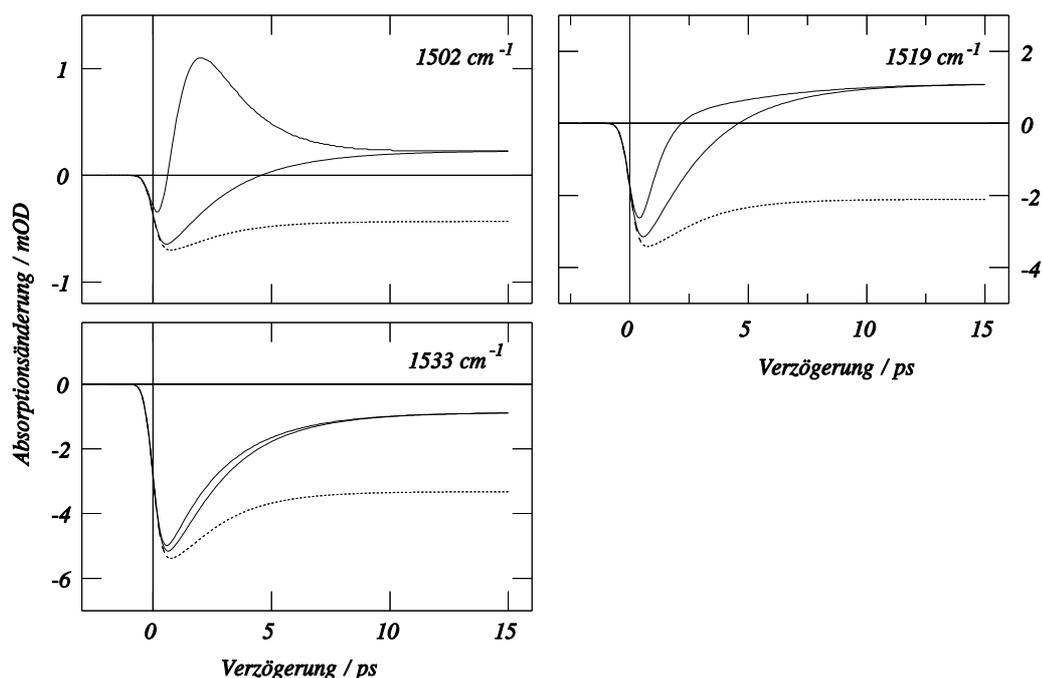


Abbildung 53: Auswirkung der Bandenerweiterung auf den Verlauf ausgewählter Kinetiken. Jede Teilabbildung zeigt drei Signale, die sich ergeben, wenn bei der Simulation nur eine ausgewählte Anzahl an Banden berücksichtigt wird. Die gepunktete Linie folgt aus der alleinigen Existenz der Grundzustandsbande *BR*. Die dünne Linie zeigt die spektrale Auswirkung in Gegenwart der Grundzustandsbande *BR* und des *K*-Dublettes *K1* und *K2*. Die dicke Linie ergibt sich schließlich, wenn bei der Simulation alle vier Banden *BR*, *K1*, *K2* und *OT* Berücksichtigung finden.

des Prozentsatzes der angeregten Moleküle wieder. Im Ratenmodell existiert eine Verzweigung im *I*-Intermediat, wodurch eine Rückrelaxation der angeregten Moleküle ermöglicht wird. Diese Relaxation äußert sich in einem Rückgang der betrachteten Amplitude. Zu späteren Zeiten befinden sich der Bruchteil *p* der angeregten Moleküle im *K*-Intermediat. Für beide Amplituden gilt dann im Rahmen des Modells:¹⁶⁰

$$N_{BR}(\infty) - I = N_K(\infty). \quad (103)$$

Setzt man den maximalen Prozentsatz der angeregten Moleküle in Beziehung mit den erfolgreich weiter reagierenden und dadurch den *K*-Zustand erreichenden Moleküle, dann spiegelt sich in dem Quotienten

$$q = \frac{\text{Min}(N_{BR} - I)}{N_{BR}(\infty)} \quad (104)$$

die Quanteneffizienz *q* für die Vorwärtsreaktion wieder.

Steht im Gegensatz zu dieser Arbeit die Ermittlung der Quanteneffizienz im Vordergrund der Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie, dann ist folgendes zu beachten: Werden die gemessenen Signale mit einer im Vergleich zur Rückrelaxationszeit (450 fs) zu geringen Zeitauflösung abgetastet, dann kommt es durch mittelnnde Effekte zu einer Vergrößerung der durch Gleichung (104) ermittelten Quanteneffizienz. Ist der Anregungspuls auch zu lange, dann können rückrelaxierte

¹⁶⁰ "∞" bedeutete groß im Vergleich zur Zeitskala, hier also 20 ps

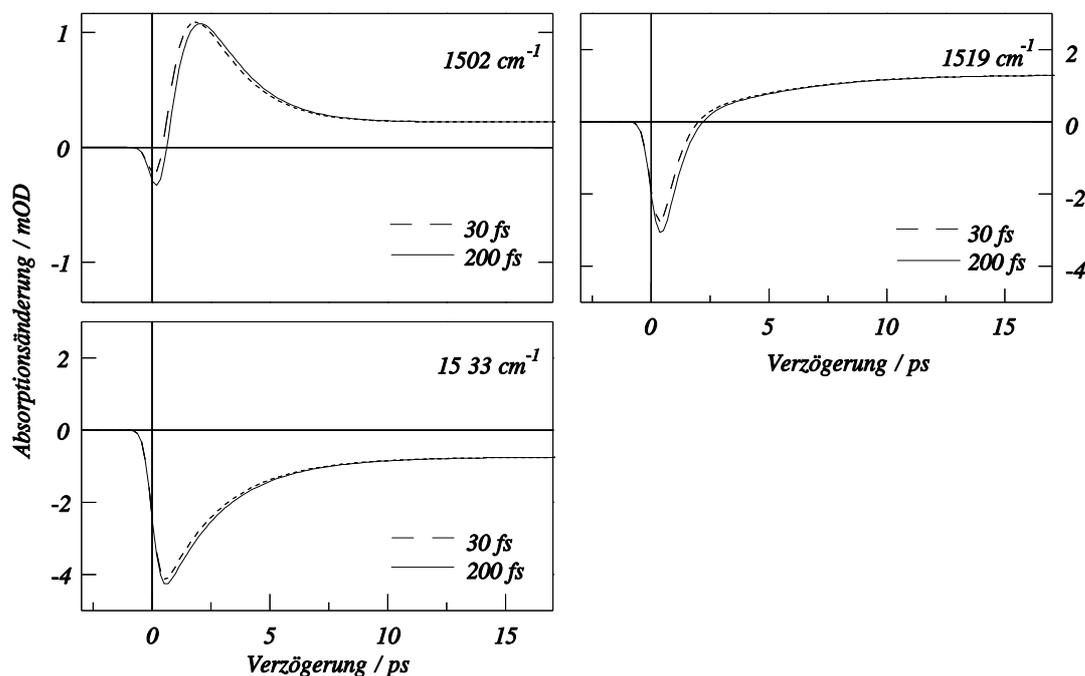


Abbildung 54: Vergleich der Auswirkung unterschiedlicher Ratenkonstanten k_i (30 fs / 200 fs) auf den zeitlichen Verlauf der simulierten Kinetiken. Die Ratenkonstanten stammen aus konkurrierenden Potentialmodellen Zinth/Mathies und Anfinrud.

Moleküle zweimal vom gleichen Anregungspuls angeregt werden, wodurch die Quanteneffizienz zusätzlich vergrößert wird.

Werden die aus den Ratengleichungen folgenden zeitabhängigen Besetzungswahrscheinlichkeiten in Gleichung (102) eingesetzt, dann erhält man die Bandenerweiterung. Spektroskopisch bedeutet sie, daß ausgewählte Zustände des Grundzustandes (BR , OT , $K1$, $K2$) mit einer Infrarotbande verknüpft werden, deren Amplitude durch die Besetzung der Zustände bestimmt werden. Der unterschiedliche Einfluß der vier Banden BR , OT , $K1$ und $K2$ auf den Verlauf der Kinetiken soll an Hand von Abbildung 53 diskutiert werden. Wird nur die Grundzustandsbande berücksichtigt, dann erhält man eine Kinetik, die schon im Zusammenhang mit der zeitabhängigen Besetzungswahrscheinlichkeit $N_{BR}-I$ diskutiert wurde. Der Einfluß des K -Dublettes erfolgt in einer zusätzlichen Absorption zu späteren Zeiten. Würde dieser Einfluß obwohl existent in einer Interpretation ignoriert werden, dann käme es die Quanteneffizienz von 0.6 betreffend zu einem Widerspruch. Die OT -Bande dominiert, bedingt durch ihre bei 1511 cm^{-1} liegende Position den niederenergetischen Bereich der dargestellten Kinetiken und führt deshalb zu einer ausgeprägten Änderung des zeitlichen Verlaufes bei 1502 cm^{-1} . Hier ergibt sich auch die stärkste Verschiebung des scheinbaren Nullpunktes. Mit größerer Entfernung zu dem Absorber OT wird die Verschiebung kleiner. Die Bleichsignale können deshalb herangezogen werden, um die Genauigkeit der Nullpunktsbestimmung zu überprüfen.

Um den Einfluß der Rate k_i , die je nach zu Grunde gelegtem Potentialmodell (Zinth/Mathies oder Anfinrud) die Werte $(200\text{ fs})^{-1}$ oder $(30\text{ fs})^{-1}$ annehmen kann, auf die Simulation zu prüfen, wurde in Abbildung 54 für drei charakteristische Wellenzahlen die Simulation durchgeführt. Ist die Rate k_i größer, dann wird der Grundzustand schneller aufgefüllt und die OT -Bande schneller populiert.

Das führt im Fall der beiden hochenergetischen Kinetiken zu einer Reduktion der Bleichbande und im Fall der niederenergetischen Kinetik zu einem schnelleren Erscheinen der absorptiven *OT*-Bande.

Alle drei Beispiele zeigen, daß die Änderungen im Signalverlauf je nach verwendetem Wert von k_l kleiner als das Signal/Rausch-Verhältnis der experimentellen Kinetiken ist. Deshalb besteht Freiheit in der Wahl dieses Parameters. Trotz der aus numerischen Gründen erfolgten Festlegung von $k_l = (200 \text{ fs})^{-1}$ ist damit keine Entscheidung für eines der beiden konkurrierenden optischen Modelle (Zinth/Mathies, Anfinrud) verbunden oder möglich.

4.2.3 Die Simulation

Unter Verwendung der Parameter aus den Tabellen 7 und 6 wurden Simulationen durchgeführt und zusammen mit den experimentellen Ergebnissen in Abbildung 55 dargestellt. Um die Qualität bewerten zu können, muß daran erinnert werden, daß durch die nachträgliche Korrelation der Kinetiken zueinander Ungenauigkeiten bezüglich der Amplitude und des Nullpunktes entstanden sind. Die richtige Beschreibung des zeitlichen Verlaufes einer Kinetik ist deshalb wichtig. Abweichungen bezüglich des zeitlichen Nullpunktes und der Gesamtamplitude sind dagegen eher zu tolerieren.

Der dargestellte Vergleich zeigt, daß das Modell den zeitlichen Signalverlauf der Kinetiken mit Bleichsignalen quantitativ reproduziert. Bei den Kinetiken mit absorptiven Signalen ist der simulierte scheinbare Nullpunkt verschieden vom experimentellen, und es zeigt sich zusätzlich ein Bleichsignal in der Nähe des experimentellen Nullpunktes, das in den experimentellen Daten nicht wiederzufinden ist. Die Simulation gibt diese Kinetiken nur qualitativ wieder.

4.3 Diskussion

4.3.1 Das Modell

Bei der mathematischen Formulierung zur Berechnung der Besetzungen der Zustände muß nicht auf den Dichtematrixformalismus zurückgegriffen werden. Folgende Abschätzung wird zeigen, daß sich beim Anregungsprozeß vom elektronischen Grundzustand BR_{570} in den Franck-Condon-Bereich FC der elektronisch angeregten Potentialfläche S_l auf Grund der schnellen elektronischen Dephasierungszeit und der zu geringen Anregungsintensität im Maximum des Intensitätsverlaufes des Anregungspulses keine Rabioszillationen ausbilden können. Für den Absorptionskoeffizienten in der Zwei-Niveau-Näherung und bei kleiner Suszeptibilität gilt¹⁶¹ einerseits:

$$\alpha = \frac{4\pi}{c\hbar} n_{BR} \omega_{BR570} / \mu_{BR570}^2 T_2 \quad (105)$$

Andererseits ist der Koeffizient α mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ_{BR} , der Flächenanzahldichte c_F und der Dicke der Probe l durch $\alpha = \epsilon_{BR} c_F / l$ verbunden. Die zur Berechnung der Rabifrequenz benötigte Amplitude $|E|$ des elektrischen Feldes erhält man aus

¹⁶¹ Boyd R.W., *Nonlinear optics*, Academic Press 1992, 199 ff

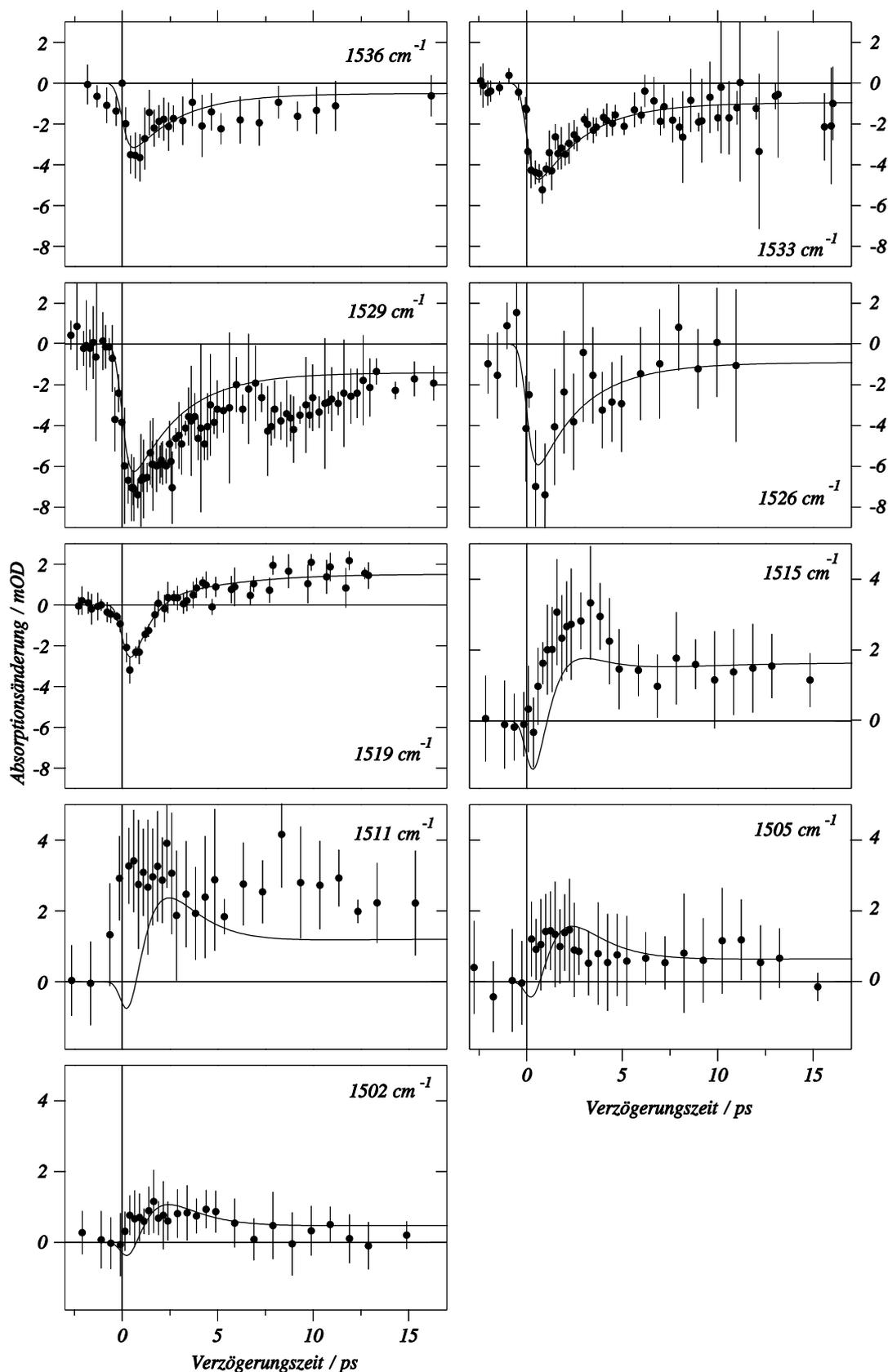


Abbildung 55: Vergleich von Simulation (durchgezogene Linie) und Experiment der Subpikosekunden-Infra-rotabsorptionsmessungen der Ethylenbande des Bakteriorhodopsins nach optischer Anregung bei 540 nm.

der Intensität I durch:¹⁶²

$$I = \frac{n_{BR570} c}{2\pi} |E|^2 \approx \frac{c}{2\pi} |E|^2. \quad (106)$$

Damit gilt:

$$\Omega_R = \sqrt{\frac{2 I \epsilon_{BR} \lambda_{BR570}}{h c T_2}}. \quad (107)$$

Die Energie des Pumpimpulses beträgt typischerweise 500 nJ, seine Pulsbreite 0.5 ps und wird durch Linsen auf 200 μm fokussiert. Als typische T_2 -Zeit werden 50 fs angesetzt. Damit läßt sich die Rabi-Frequenz abschätzen und man erhält $\Omega_R \approx 1/160 \text{ fs}^{-1} \approx 0.3 / T_2$. Ein Vergleich mit Abbildung 16 auf Seite 36 zeigt die Richtigkeit der Behauptung.

Nachdem der Dauerstrich-CO-Strahl im Vergleich zum Anregungspuls eine um viele Größenordnungen kleinere Intensität hat, darf die Wechselwirkung von Zuständen mit diesem Laserstrahl auch mit Hilfe eines Ratenmodells beschrieben werden.

Die hier betrachteten Schwingungszustände (BR , OT , $K1$, $K2$) der elektronischen Grundzustandspotentialfläche S_0 können sich erst ausbilden, wenn die zugehörigen elektronischen Zustände existieren. Im Modell müßten deshalb die Ratenkonstanten der Schwingungszustände mit den Ratenkonstanten, welche die Entstehung elektronischer Zustände beschreiben, gefaltet werden. Das präsentierte Modell stellt diesbezüglich eine Vereinfachung dar. Die Ratenkonstanten k_{BR} , k_{OT} enthalten deshalb einerseits einen elektronischen Anteil. Andererseits zeigte die Diskussion im Kapitel 2.3.2 zum Thema "Kohärenz und verschiebende Banden", daß ein instantan geschaffener Absorber in der Kinetik zu einem absorptiven Signal führt, welches bei deltaförmigen Anregungs- und "gate"-Pulsen durch die Schwingungsdephasierungszeit (T_2) bestimmt wird. Aus den Linienbreiten 17 cm^{-1} und 20 cm^{-1} der verwendeten Banden lassen T_2 -Zeiten von 0.6 ps und 0.5 ps ableiten, die auch Teil der Ratenkonstanten sind.

Im Kapitel 2.3 wurden weitere kohärente Phänomene diskutiert, die nicht Teil der mathematischen Formulierung der vorgestellten Simulation sind. Auf Grund des Systemrauschens (1mOD) können Oszillationen des gestörten freien Induktionszerfalls¹⁶³ und der Schwebungsozillationen auf Grund der Interferenz des Probestrahles mit der generierten Polarisation in der Probe nicht detektiert werden. Der optische Kerr-Effekt kann durch den Anregungspuls im Küvettenmaterial eine Polarisationsdrehung des Abfragestrahles induzieren. Dieser Prozeß hat aber nur eine Auswirkung, wenn die Polarisationsrichtung von Anregungs- und Abfragestrahl nicht wie in dieser Arbeit gleich, sondern verschieden (idealer Weise 45°) sind. Dagegen läßt sich das Ausbilden einer Kerrlinse nicht vermeiden. Mögliche Folgen wurden durch Optimieren des "gate-Prozesses" minimiert. Eine Testmessung mit CaF_2 als Probe zeigte zudem, daß im Rahmen der experimentellen Ungenauigkeit in der Absorptionsänderung von 1mOD keine Signale zu finden waren, wodurch auch ein detektierbarer Einfluß der Kreuzphasenmodulation von Anregungspuls und Probestrahl ausgeschlossen werden konnte.

Bei der Zuordnung der OT -Bande wurde auf Ergebnisse statischer Resonanz-Raman Messungen

¹⁶² Boyd R.W., *Nonlinear optics*, Academic Press 1992, 432

¹⁶³ Der Begriff des "gestörten freien Induktionszerfalls" wird nur im Zusammenhang mit Abfragepulsen verwendet. Für den Fall eines Dauerstrichstrahles als Probestrahl gibt es eigentlich keine Bezeichnung, obwohl der Sachverhalt der gleiche ist. Hamm P., persönliche Mitteilung

von Myers et al und auf zeitaufgelöste Resonanz-Raman-Messungen der Ethylenbande von Bakteriorhodopsin von Van den Berg et al¹⁶⁴ zurückgegriffen. Die Zeitauflösung der Experimente von Van den Berg et al betrug 800-900 fs. Das Spektrum¹⁶⁵ wird von einer Bande bei 1518 cm⁻¹ mit einer deutlichen Schulter bei 1510 cm⁻¹ gebildet. Letztere wurde mit einem Vorläufer des *J*-Intermediates identifiziert. Die Autoren übersahen, daß bei der gegebenen Zeitauflösung auch schwingungsangeregte Zustände des elektronischen Grundzustandes *BR*₅₇₀ zum Gesamtsignal beitragen können und daß das Meßergebnis die vorläufige Zuordnung von Myers et al, einer bei 3036 cm⁻¹ liegenden Obertonbande des elektronischen Grundzustandes der Ethylenbande, stützt.

Die Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie ist sensitiv gegenüber Schwingungsmoden des Chromophors und des Proteins. Nachdem das spektrale Beobachtungsfenster Teil der langwelligen Flanke der Amid-II-Bande ist, kann diese Bande prinzipiell einen Beitrag zur gemessenen Absorptionsänderung liefern. Tieftemperatur-(77 K) FTIR-Differenzabsorptionsmessungen vom Grundzustand und *K*-Intermediat¹⁶⁶ zeigen, daß Beiträge der Amid-II Bande vorwiegend um 1550 cm⁻¹ zu finden sind. Überträgt man die dort gefundenen Amplituden auf die experimentellen Gegebenheiten der vorliegenden Arbeit, dann wären Amplituden unterhalb von 0.5 mOD auf Grund dieser Banden zu erwarten. Die daraus resultierende Absorptionsänderung wäre zu klein, um einen nennenswerten Beitrag liefern zu können, weshalb für diese Arbeit ein Proteineinfluß nicht weiter berücksichtigt werden muß.

Alternativ zur vorliegenden Modellierung der Schwingungsrelaxation mit Hilfe weniger, untereinander nicht gekoppelter Normalmoden existiert eine komplexere Beschreibung von Hamm et al.¹⁶⁷ Die Autoren nutzen den *cis*→*trans*-Isomerisierungsprozeß von Azobenzol¹⁶⁸ nach optischer Anregung aus, um *cis*- und *trans*-Azobenzolschwingungen anzuregen damit sie anschließend deren Relaxationsprozeß mit Hilfe der Femtosekunden-Infrarotspektroskopie im Spektralbereich von 1400 cm⁻¹ - 1550 cm⁻¹ verfolgen können. Die zeitabhängigen Spektren werden nahezu quantitativ mit Hilfe eines Modells simuliert, in dem die zu untersuchenden Banden an ein Bad, gebildet durch die restlichen Normalmoden, gekoppelt sind. Diese vorerst statische Beschreibung erhält durch zeitabhängige Verteilungsfunktionen höher angeregter Schwingungszustände aller Normalmoden eine Zeitabhängigkeit. Die Übertragung auf den Chromophor von Bakteriorhodopsin erscheint sehr zweifelhaft, da die für das Modell unerläßlichen höheren Schwingungszustände für den Chromophor weder experimentell noch theoretisch in Form von Anharmonizitätskoeffizienten vorliegen. Man könnte versuchen, "Chromophor + komplexes Gegenion + Protein" durch ein Polypren in Lösung zu ersetzen. Hamm et al zeigten allerdings im Fall von Azobenzol, welches sie mit Hilfe von Benzolparametern beschrieben, daß selbst bei diesem einfachen und kleinen Molekül nur eine nahezu quantitative Beschreibung möglich ist. Im hier vorliegenden komplexeren Fall des Bakteriorhodopsins wären bei der erwogenen starken Vereinfachung eher Aussagen über die Güte der Modellierung als Schlußfolgerungen bezüglich des Chromophors möglich.

4.3.2 Die zeitliche Grobstruktur

Die zeitliche Grobstruktur des Rückganges der Bleichsignale spiegelt auf den ersten Blick nicht die

¹⁶⁴ Myers A.B. et al., J. Chem. Phys. **79** (1983), 603; Van den Berg et al., Biophys. J. **58** (1990), 135

¹⁶⁵ Spektralbereich: 1440 cm⁻¹ - 1620 cm⁻¹

¹⁶⁶ Siebert et al, Eur. J. Biochem. **130** (1983), 565

¹⁶⁷ Hamm P. et al, J. Chem Phys. **106** (1997), 519

¹⁶⁸ Azobenzol besteht aus zwei Benzolringen, die über eine Azoverbindung "-N=N-" miteinander verbunden sind.

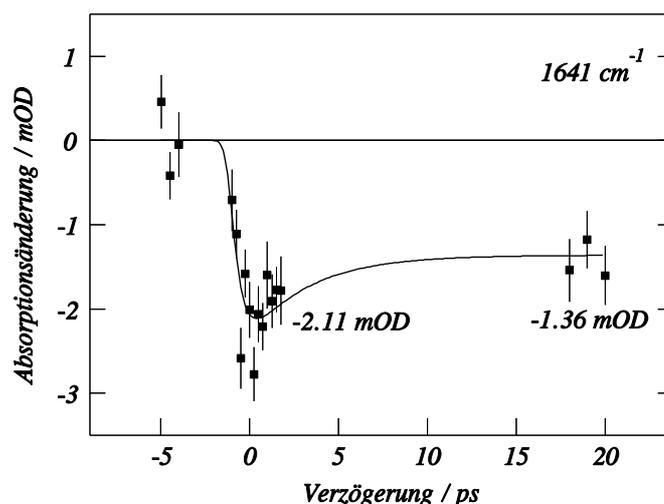


Abbildung 56: Ergebnis der Subpikosekundenmessung der CN-H-Schwingung von Bakteriorhodopsin bei 1641 cm^{-1} nach optischer Anregung bei 540 nm . Angegeben sind auch die maximale und die Amplitude zu späteren Zeiten (20 ps).

aus der Literatur bekannte Quanteneffizienz von 0.6 für ein erfolgreiches Weiterreagieren zum K -Intermediat wider. In einer einfachen Interpretation wird dieser Rückgang durch jene Moleküle hervorgerufen, die nach Anregung nicht isomerisieren, dem Kreiszyklus also nicht weiter folgen, sondern in den Grundzustand zurückrelaxieren. Aus dem Quotienten der maximalen Amplitude und der Amplitude zu späteren Zeiten läßt sich nach dieser Interpretation ein Wert für die Quanteneffizienz von 25% ableiten, der deutlich zu klein ist. Um eine fehlerhafte Probenpräparation ausschließen zu können, wurde als Testmessung das Amplitudenverhältnis der CN-H-Streckschwingung bei 1641 cm^{-1} experimentell ermittelt (Abbildung 56). Es beträgt 64% und stimmt mit dem, aus der Literatur¹⁶⁹ bekannten Wert von 62% sehr gut überein.

Vergegenwärtigt man sich den Verlauf der Besetzungszahlen der beteiligten Zustände, dann könnte man zu dem Schluß kommen, daß die unbefriedigende Übereinstimmung der Simulation im zeitlichen Anfangsbereich der rein absorptiven Kinetiken durch zusätzliche, mit den Zuständen S_1^* oder I verknüpften Absorptionssignalen verbessert werden kann. Dies stünde aber im Widerspruch zu der bei der Modelleinführung im Kapitel 4.2.1 gemachten und auf die Literatur¹⁷⁰ gestützten Annahme, daß die mit den angeregten Zuständen verknüpfte Ethenbande eine um mehr als 100 cm^{-1} große Verschiebung erfährt. Eine Verbesserung der Simulation ist dagegen zu erwarten, wenn der POT -Zustand, der notwendig für eine freie Wahl der Ratenkonstante k_{OT} ist und die Entstehung des elektronischen Grundzustandes beschreibt, durch eine Faltung der Ratenkonstanten für die Schwingungszustände k_{OT} und k_{BR} mit der elektronischen Ratenkonstante k_{ges} ersetzt wird. Keine Verbesserung läßt sich erzielen, wenn der OT -Zustand wegfällt und der J -Zustand mit einer Infrarotbande zwischen 1511 cm^{-1} und 1518 cm^{-1} verknüpft wird.

Der die wahre Quanteneffizienz verdeckende Verlauf der reinen Bleichsignale wird in diesem Modell hauptsächlich durch die Grundzustandsbleichbande und die K -Doppelbande bestimmt. Nachdem letztere in der Literatur nur durch Resonanz-Raman-Messungen dokumentiert sind, ist das Verhältnis der Amplituden im Infrarot-Absorptionsfall nicht festgelegt und deshalb im Modell

¹⁶⁹ Diller R. et al, Chem Phys. Lett. **241** (1995), 109

¹⁷⁰ Kamalov V.F. et al, J. Phys. Chem. **100** (1996), 2762

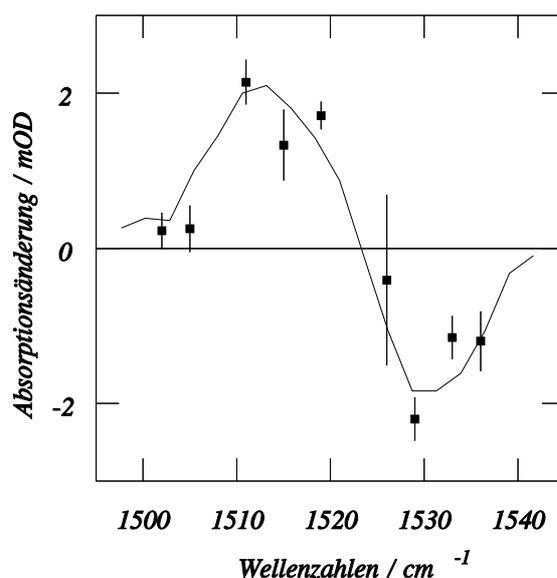


Abbildung 57: Vergleich eines, aus den in dieser Arbeit präsentierten experimentellen Kinetiken abgeleiteten *BR-K*-Differenzspektrums der Ethylenbande bei Zimmertemperatur mit einem Tieftemperatur (77 K)-*BR-K*-Differenzspektrum.

ein freier Parameter. Antistokes-Resonanz-Raman-Messungen¹⁷¹ an Bakteriorhodopsin nach optischer Anregung zeigen eine bei 1521 cm^{-1} stark verbreiterte Bande, die einem *K*-Vorläufer zugeordnet wird und deren Amplitude mit einer Zeitkonstante von $2.5 \pm 1\text{ ps}$ zerfällt. Mit diesem Zerfall geht eine Verminderung der Bandenbreite einher. Diese Messungen belegen, daß ein schwingungsangeregter Chromophor mehrere Pikosekunden nach optischer Anregung vorliegt. Zugehörige theoretische Rechnungen¹⁷² sprechen für schwingungsangeregte Franck-Condon aktive Schwingungsmoden, die mehrere Pikosekunden nach optischer Anregung mehr Energie besitzen als mit einer vollständigen innermolekularen¹⁷³ Energieumverteilung verträglich ist. Ein Schwingungsinversionszustand im elektronischen Grundzustand BR_{570} , hervorgerufen durch die Rückrelaxation nach Verzweigung im Grundzustand *I* des elektronisch angeregten Potentials S_1 , kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Er würde bei den Messungen dieser Arbeit über stimulierte Emission einen zusätzlichen Beitrag zum scheinbar zu großen Bleichsignal liefern. Dieser zusätzliche Beitrag ist experimentell nicht von der aus dem Wellenzahlfenster schiebenden Grundzustandsbleichbande zu unterscheiden. Durch die angesprochene Freiheit in der Wahl der *K*-Banden können mit Hilfe des vorgestellten Modells stimulierte Emission und damit verbundene Inversionszustände untersuchter Schwingungsmoden weder ausgeschlossen noch nachgewiesen werden.

Faßt man diejenigen Meßpunkte der in Abbildung 55 dargestellten experimentellen Kinetiken zusammen, welche das konstante Signal zu späteren Zeiten festlegen und trägt sie gegen die jeweilige Wellenzahl auf, dann erhält man ein *BR-K*-Differenzspektrum bei Zimmertemperatur. In Abbildung 57 wird es mit einem durchgezogen dargestellten und in seiner Amplitude angepaßten

¹⁷¹ Doig J.S. et al, J. Phys. Chem. **95** (1991), 6372

¹⁷² Shreve A.P. et al, J. Phys. Chem. **99** (1995), 7285

¹⁷³ intramolekular = innermolekular <> intermolekular = zwischenmolekular

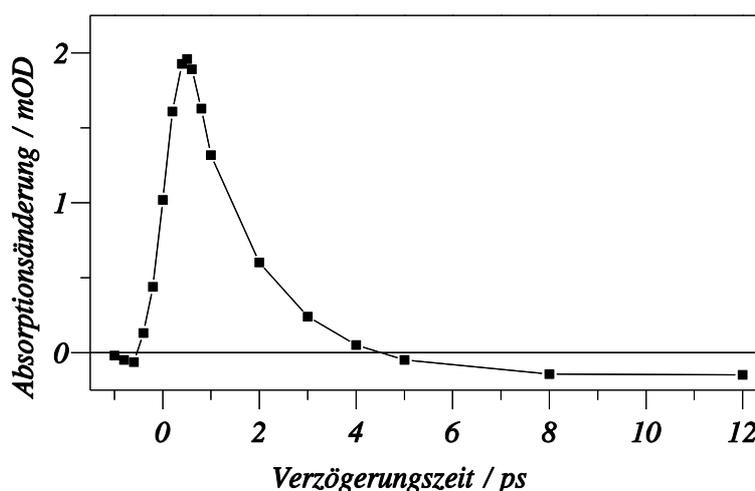


Abbildung 58: Aus den zeitabhängigen Spektren $\Delta OD(\delta, \nu)$ der Ethylenbande des Bakteriorhodopsins abgeleitete zeitabhängige integrierte Absorptionsänderung $\Delta OD(\delta)$.

statischen Tieftemperatur (77 K) BR-K-Differenzspektrum¹⁷⁴ aus der Literatur verglichen. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ergibt sich eine gute Übereinstimmung, woraus folgt, daß die Ethylenbande des *K*-Intermediates auf einen kalten Schwingungszustand schließen läßt.

Berechnet man das Integral der Spektren, normiert sie auf die Breite (44 cm^{-1}) und trägt die so ermittelten Punkte gegen die Verzögerungszeit auf, dann erhält man die in Abbildung 58 gezeigte zeitabhängige integrierte Absorptionsänderung. Sie zeigt einen mit Anregungs- und "gate"-Puls gefalteten monoexponentiellen Zerfall, der durch eine Zeitkonstante von $1.398 \pm 0.056 \text{ ps}$ beschrieben wird und eine über alle infrarotspektroskopisch aktiven Zustände gemittelte Relaxation des trans-cis-Isomerisierungsprozesses beschreibt. Die integrierte Absorptionsänderung bei 12 ps beträgt -0.14 mOD . Berücksichtigt man die Ungenauigkeiten des Ursprunges dieser Kinetik, dann ist dieser Wert mit Null verträglich. Nach Kapitel 2.3.4 wird die integrierte Absorptionsänderung durch die Besetzungswahrscheinlichkeiten $N_x(\tau)$ und die Amplituden ϵ_x der Extinktionskoeffizienten der beteiligten Zustände beschrieben:

$$\Delta OD(\tau) \sim \sum_x N_x(\tau) \epsilon_x \quad (108)$$

Zum Zeitpunkt 12 ps tragen nur zwei Zustände, nämlich der Grundzustand und die *K*-Dublette zum Signal bei. Nimmt man zusätzlich Teilchenzahlerhaltung an, d.h. die durch den Pumpimpuls angeregten Moleküle befinden sich in einem der Zustände *BR* oder *K*, dann muß die zu ϵ_x proportionale Oszillatorstärke der Zustände *BR* und *K* gleich sein.

4.3.3 Die zeitliche Feinstruktur

Mit der zeitlichen Feinstruktur wird der in der experimentellen Kinetik bei 1529 cm^{-1} deutlich zu sehende und der sich bei 1526 cm^{-1} andeutende Nachschwinger bezeichnet. Die zugehörigen Zeitnullpunkte, Amplituden und relativen Amplituden sind in Tabelle 8 angegeben. Im folgenden werden mögliche Ursachen diskutiert.

¹⁷⁴ Siebert F. et al, Eur. J. Biochem. **130** (1983), 565

Kinetik	Energie	Zeitnullpunkt	Amplitude	rel. Amplitude
1529 cm ⁻¹	(1, 1.3, 0.4) μJ	8 ps	2 mOD	1/4
1526 cm ⁻¹	1.3 μJ	3 ps	1.5 mOD	1/4

Tabelle 8: Zusammenfassung der charakteristischen Merkmale des Nachschwingers. Der Zeitnullpunkt bezieht sich auf die Mitte des zusätzlichen Bleichsignals und die Energie auf den Pumpuls. Bei der Amplitudenbestimmung wurde der Signalverlauf der jeweiligen Kinetik berücksichtigt.

Eine schlechte Justage der Pockelszelle im regenerativen Verstärker könnte dazu führen, daß neben dem eigentlichen Hauptpuls auch ein Nachpuls den Verstärker des Ti:Sa Femtosekundenlasersystems verläßt und somit ungewollt zwei zeitlich verzögerte Anregungspulse vorhanden sind. Der Resonator des Verstärkers bedingt den zeitlichen, im Nanosekundenbereich liegenden Abstand dieser Pulse. Deshalb kann diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

Rechnet man die zeitliche Verzögerungen der Nachschwinger mit Hilfe der Laufzeit von Licht in Luft in eine Länge um, dann erhält man die Abstände 1 mm bzw. 2.4 mm. Nimmt man an, daß die Nachschwinger von einem durch Reflexion an einer Optik erzeugten Nachpuls stammen, dann müßte die Optik oder die Optiken eine maximale Dicke von 0.5 mm bzw. 1.2 mm aufweisen. Als Kandidat für die gesuchte Optik käme die Weißlichtküvette in Frage. Gegen diese Annahme spricht allerdings die mit 25% zu große relative Amplitude, die einen Nachpuls mit einer Energie von 25% des Hauptpulses voraussetzt.

Eine Mehrfachanregung nicht relaxierter Moleküle auf Grund einer fehlerhaften Hub- oder Rotationsfrequenz des Probenhalters kann nicht zu dem betrachteten Zeitverlauf führen. Als Grenzfall sei die Hubfrequenz Null gesetzt. Auf Grund der Rotationsfrequenz von 18 Hz werden die Moleküle dann im Abstand von $5.6 \cdot 10$ ms angeregt. Diese Zeitdifferenz ist mehrere tausend Mal größer als die Zerfallskonstante des *K*-Intermediates von $\approx 1\mu\text{s}$. Es besteht deshalb keine Möglichkeit, durch einen ersten optischen Anregungspuls das *K*-Intermediat zu bevölkern, um es auf Grund einer fehlerhaften Hub- oder Rotationsfrequenz ungewollt mit einem zweiten Anregungspuls zu entvölkern.

Polland et al¹⁷⁵ untersuchten den Einfluß der Leistungsdichte des Anregungspulses auf die Signalsättigung für den Fall optischer Pikosekunden-Anregungs-Abfrage-Experimente an Bakteriorhodopsin. Sie geben eine Schwelle von 15 GW/cm² an. Wird sie überschritten, dann tritt eine Sättigung der gemessenen Signale ein, die zu einer Verfälschung damit verbundenen Zeitkonstanten führen kann. Die Autoren verwandten bei ihren Messungen deshalb Anregungspulse mit einer Leistungsdichte von 0.17 GW/cm². Die Existenz eines Nachschwingers als zusätzliches Bleichsignal einer absorptiven Kinetik bei 640 nm, als Folge von optischen Anregungs-Abfrage-Messungen an Bakteriorhodopsin ist in der Veröffentlichung von Haran G. et al¹⁷⁶ zu sehen, die allerdings von diesen Autoren ignoriert wird. Der Pumpuls wurde wie in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Weißlicht und nachfolgendem Interferenzfilter (Firma Corion, 550 nm, 50 nm FWHM) generiert und hatte wahrscheinlich eine Leistungsdichte¹⁷⁷ von 16 GW/cm². Es besteht damit die

¹⁷⁵ Polland et al, Biophys. J. **49** (1986), 651

¹⁷⁶ Haran G. et al, Chem. Phys. Lett. **261** (1996), 391, Fig. 2

¹⁷⁷ Die Autoren benötigten für ihre Experimente zwei Anregungswellenlängen (550 nm, 405 nm), die sie auf unterschiedliche Weise erzeugten. Die Langwellige wurde, wie in den hier vorgestellten Experimenten, mit Hilfe von Weißlicht erzeugt, die Kurzwellige durch Frequenzverdopplung der vom fs-Lasersystem stammenden und bei 810 nm liegenden Fundamentalwellenlänge. Nur für den letzten Fall geben sie an, daß die Energie der Anregungspulse durch

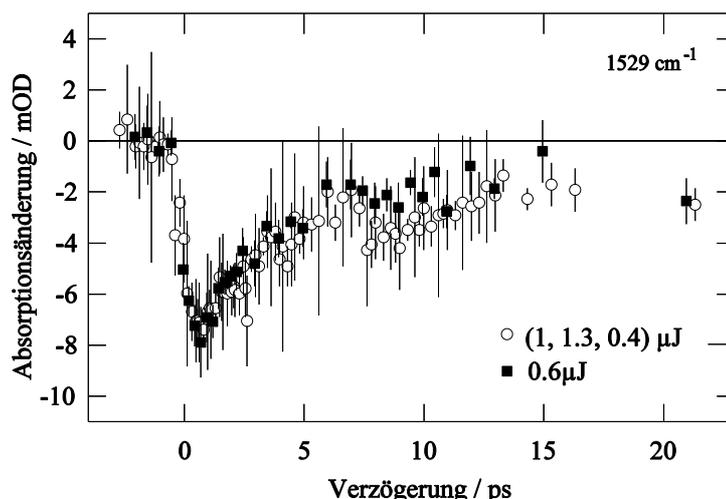


Abbildung 59: Einfluß unterschiedlicher Proben auf den Nachschwinger. Die durch "■" gekennzeichnete Kinetik gehört zu einer ultraschallbehandelten Bakteriorhodopsinprobe vom Stamm S9, bei der das Azid herausgewaschen wurde.

Möglichkeit, daß das Meßartefakt eine Folge einer zu hohen Anregungsenergie ist. Vergleicht man den zitierten optischen Fall mit den Infrarotexperimenten, dann zeigt sich, daß die hier verwendeten Leistungsdichten¹⁷⁸ von 3-6 GW/cm² vergleichbar und um einen Faktor 30 größer als die von Polland et al empfohlenen sind. Allerdings hätte das Infrarotexperiment bei einer derartig geringen Leistungsdichte nicht durchgeführt werden können.

Abbildung 59 zeigt zwei Kinetiken unterschiedlicher Proben, die durch "■" und "○" gekennzeichnet sind und sich in der Relaxationszeit für das Bleichsignal, der Amplitude des Nachschwingers und der Amplitude zu späteren Zeiten unterscheiden. Die zur "■"-Kinetik gehörende Probe unterscheidet sich in drei Punkten von den sonst verwendeten. Das Bakteriorhodopsin stammt von Stamm S9, die Lösung wurde mit Ultraschall behandelt, um agglomerierte Moleküle zu lösen und Azid wurde herausgewaschen. Der Stamm S9 bildet im Vergleich zu ET1001 kleinere Bakteriorhodopsinpatches, die durch die Ultraschallbehandlung in noch kleinere Einheiten zerfallen.¹⁷⁹ Dadurch verändert sich das Verhältnis von Bakteriorhodopsintrimeren, Dimeren und Monomeren zu Gunsten der beiden letztgenannten. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß der Rückgang des Nachschwingers in der mit "■" gekennzeichnete Kinetik eine Folge einer veränderten Quartärstruktur ist. Azid beeinflusst den Fotozyklus.¹⁸⁰ Die Untersuchungen beschränken sich derzeit auf den Zeitbereich oberhalb 1 µs. Sie belegen, daß sich Azid (N₃⁻) in der Nähe von Asp85 befindet und von dort aus das Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Asp96 und der Schiffchen Base des Retinals derart beeinflusst, daß die Reprotonierung der Schiffchen Base beschleunigt wird. Mit dieser Reprotonierung ist das *M*-Intermediat verbunden, welches aus dem beschriebenen Grund in Gegenwart von Azid schneller zerfällt. Die in dieser Arbeit verwendeten

zusätzliche Optiken auf 100 nJ abgeschwächt wurde. Setzt man das als Grenzenergie an, berücksichtigt man die bei 40-60 fs liegenden Pulsbreiten und nimmt man zusätzlich eine Fokusbildung von 200 µm an, dann erhält man für die Leistungsdichte einen Wert von 16 GW/cm².

¹⁷⁸ Energie: 1µJ, Fokusbildung: 200 µm, Pulsbreite: 500 fs

¹⁷⁹ Alexiev U., private Mitteilung, Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin

¹⁸⁰ Ormos P. et al, Photochem. Photobiol. **B40** (1997), 111; Radionov A.N. et al, FEBS Lett. **387** (1996), 126; Le Coultre J. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92** (1995), 4962, Tottor J. et al, EMBO J. **8** (1989), 3477

geringen Azidkonzentrationen sollten keinen Einfluß auf den Fotozyklus haben. Tatsächlich zeigt die optische Nanosekunderspektroskopie, die zur Charakterisierung der präparierten Filme durchgeführt und in Kapitel "3.5 Probenpräparation und Charakterisierung" beschrieben wird, daß eine Beschleunigung des Zerfalls des *M*-Intermediates nicht beobachtet werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß der Nachschwinger weder eine Folge von Mehrfachpulsen eines schlecht justierten Femtosekundenlasersystems noch Mehrfachreflexionen an Optiken, noch eine Folge einer Mehrfachanregung auf Grund einer fehlerhaften Rotations- oder Hubfrequenz des Probenhalters sein kann. Dagegen kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine zu hohe Leistungsdichte der Anregungspulse oder eine veränderte Quartärstruktur die Ursache ist. Der Nachschwinger beeinflußt die Zeitkonstante der Rückrelaxation, weshalb die in dieser Arbeit angegebenen Ratenkonstanten aus diesem Grund eine obere Grenze darstellen.

4.3.4 Die Natur des *J*-Zustandes

Eine Vielzahl von Anregungs-Abfrage-Experimenten mit unterschiedlicher Zeitauflösung im optischen Spektralbereich belegen, daß eine mit *J* bezeichnete und bezüglich K_{590} rotverschobene Bande existiert, die mit einer Zeitkonstante 0.5 ps entsteht und mit einer Zeitkonstante von 3 ps zerfällt.¹⁸¹ Die Zeitkonstanten für die Entstehung von *J* und für den Rückgang des Grundzustandsbleichsignals sind gleich und länger als Zeitkonstanten von optischen Banden, die Dynamiken des Chromophors auf der angeregten Potentialfläche S_1 zugeordnet werden. Deshalb kann *J* kein angeregter Zustand sein.¹⁸² Im Gegensatz zu K_{590} ¹⁸³ konnte bisher keine Fluoreszenz von *J* nach optischer Anregung nachgewiesen werden.¹⁸⁴

Die Pikosekunden Resonanz-Ramanspektroskopie¹⁸⁵ ermöglicht bedingt durch eine geringe Zeitauflösung, eine Durchführung des Experimentes als Einstrahllexperiment oder ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis kein zuverlässiges Abbild der Ramanbandenkinetiken zu frühen Zeiten. Sie können nur belegen, daß Ramanbanden auftreten, die mit den bekannten und mit den zu frühen Zeiten beteiligten Spezies BR_{570} und K_{590} nicht zur Deckung zu bringen sind. Daraus folgt aber nicht, daß eine weitere Spezies existieren muß. Eindeutiges Resultat dieser Experimente ist aber, daß der Isomerisierungsprozeß schon vor K_{590} stattgefunden hat und K_{590} in 13-cis-Form¹⁸⁶ vorliegt.

Subpikosekunden Resonanz-Raman-Spektroskopie¹⁸⁷ liefert keinen Beleg für die Existenz von *J*. Van den Berg et al versuchte, über den phänomenologisch linearen Zusammenhang zwischen der spektralen Position der Ethylenbande und den Absorptionsmaxima der Zustände im Fotozyklus die bei 1518 cm^{-1} gefundene Bande mit J_{625} zu verbinden. Andere Resonanz-Raman-Messungen¹⁸⁸

¹⁸¹ Haran G. et al, Chem. Phys. Lett. **261** (1996), 389; Dexheimer S.L. et al, Chem. Phys. Lett. **188** (1992), 61; Mathies R.A., Science **240** (1988), 777; Dobler J. et al, Chem. Phys. Lett. **144** (1988), 215; Nuss M.C., Chem. Phys. Lett. **117** (1985), 1; Sharkov A.V. et al, Biocchim. Biophys. Acta **808** (1985), 94;

¹⁸² Dexheimer S.L. et al, Chem. Phys. Lett. **188** (1992), 61; Mathies R.A., Science **240** (1988), 777

¹⁸³ Atkinson G.H. et al, Biophys. J. **55** (1989), 263

¹⁸⁴ Blanchard D. et al, Chem. Phys. **154** (1991), 155

¹⁸⁵ Blanchard D. et al., Chem. Phys. **154** (1991), 154; Atkinson G.H. et al., Chem. Phys. **131** (1989), 1; Lohrmann R. et al., Springer Proceedings in Physics **74** (1994), 208 ff; Althaus T. et al., Isr. J. Chem. **35** (1995), 227; Doig S.J. et al., J. Phys. Chem. **95** (1991), 6372; Van den Berg R. et al., Biophys. J. **58** (1990), 135

¹⁸⁶ Braiman M. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** (1982), 403

¹⁸⁷ Van den Berg R. et al., Biophys. J. **58** (1990), 135

¹⁸⁸ Althaus T. et al, Isr. J. Chem. **35** (1995), 227; Doig S.J., J. Phys. Chem. **95** (1991) 6372

zeigen, daß die Ethylenbande bei 1518 cm^{-1} mindestens bis 40 ps existent ist, womit sie nicht mit J verbunden werden kann. Die zusätzlich von Van den Berg et al gefundene Schulter bei 1510 cm^{-1} ist nicht einem Vorläufer von J zuzuordnen, sondern unterstützt die vorläufige Obertonzuordnung bei 3036 cm^{-1} der Ethylenbande im elektronischen Grundzustand von Meyers et al¹⁸⁹

Subpikosekunden-Infrarotabsorptionsmessungen zeigen eine bei 1607 cm^{-1} liegende Bande, die von den Autoren Diller et al ohne Begründung der C=NH Streckschwingung nach Anregung zugeordnet wird. Sie entsteht 0.5 ps - 0.7 ps und zerfällt mit 3.4 ps.¹⁹⁰ Die Zuordnung steht im Widerspruch zu einem Review von Althaus et al¹⁹¹. Der angegebene Zerfall von 3.4 ps wird von den Autoren auf Grund des geringen Signlrückganges im Vergleich zum erzielten Signal/Rausch-Verhältnis als nicht signifikant gewertet. Berücksichtigt man die angegebene Systemzeitauflösung von 0.4 ps und die von den Autoren angenommene Dephasierungszeit von 0.8 ps, dann kann eine Entstehung dieser Bande im angeregten Zustand nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt ist die Veröffentlichung von Diller et al damit nicht geeignet, die Existenz von J zu belegen.

Zur Natur des J -Zustandes existieren derzeit mehrere konkurrierende Vorstellungen,

I) J ist ein lokales Minimum, also ein Grundzustand der Grundzustandspotentialfläche S_0

II) J ist ein schwingungsangeregtes, also heißes K

III) J ist ein Polarisationssecho der Proteinmatrix

IV) J ist ein Scheinzustand, der aus einer Überlagerung temporärer Banden abgeleitet wurde die im folgenden diskutiert werden.

Statische FTIR¹⁹² und Tieftemperatur (77 K) Resonanz-Raman-Messungen¹⁹³ zeigen, daß sich J im Gegensatz zu K nicht stabilisieren läßt. Das wird im Allgemeinen als Hinweis für J als schwingungsangeregten K -Zustand gesehen und gegen J als ein Grundzustand gewertet. Zeitaufgelöste optische Experimente, die bei 4 K durchgeführt wurden¹⁹⁴ zeigen, daß sich die Zeitkonstante für die Entstehung von K auf 36 ps erhöht. Das spricht für einen barriereartigen Übergang von $J \rightarrow K$, wenn eine temperaturabhängige Relaxation in den Grundzustand BR_{570} ausgeschlossen wird. Damit stünde aber J nicht mehr als schwingungsangeregtes K zur Verfügung. Die bei 77 K durchgeführten und schon zitierten Messungen stehen dazu nicht im Widerspruch.

Hinweise für Vorstellung III ergibt sich aus einer Arbeit von Delany et al.¹⁹⁵ Sie konnten zeigen, daß ein künstliches Pigment $BR5.12$ eingesetzt in das Apoprotein nicht isomerisiert, aber trotzdem nach Lichtanregung eine im Vergleich zur Grundzustandsabsorption (Maximum : 578 nm) rotverschobene (ca. 660 nm) Spezies $T5.12$ ausbildet, die mit einer Zeitkonstante von 17 ± 1 ps in den Grundzustand übergeht. Obwohl auch hier die Natur des Zustandes nicht geklärt ist, würde eine noch ausstehende Zuordnung zu J_{625} von Bakteriorhodopsin dazu führen, daß J nicht mehr als ein, mit der Retinalisomerisierung verbundener Grundzustand, zur Verfügung steht. Wie Moleküldyna-

¹⁸⁹ Meyers A.B. et al, J. Chem. Phys. **79** (1983), 603

¹⁹⁰ Diller R. et al, Chem. Phys. Lett. **241** (1995), 109

¹⁹¹ Althaus T. et. al., Isr. J. Chem. **35** (1995), 227

¹⁹² Siebert F. et al, Eur. J. Biochem. **130** (1983), 565

¹⁹³ Braiman M. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** (1982), 403

¹⁹⁴ Applebury M.L. et al, Biophys. J. **23** (1978), 375; Die Entstehung von K wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm verfolgt, wo auch der Grundzustand absorbiert. Nur unter der Annahme, daß die Relaxation des Grundzustandes temperaturunabhängig ist, sind die Schlußfolgerungen der Autoren gerechtfertigt.

¹⁹⁵ Delany J.K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92** (1995), 2101

mikrechnungen¹⁹⁶ zeigen, könnte aber auch außerhalb der Isomerisierungsordinate ein Grundzustand gebildet werden. Die Autoren argumentieren für eine Absorptionsverschiebung von $BR_{568} \rightarrow L_{625}$ auf Grund einer Polarisierung der Proteinmatrix, hervorgerufen durch die nach Anregung sprunghaft erfolgende Änderung des Retinaldipolmomentes.

Jüngste Femtosekunden - Absorptionsmessungen im Optischen¹⁹⁷ erklären das im Bereich von 450 nm - 1.4 μm bei 0.316 ps gemessene Spektrum als Überlagerung einer bei 460 nm und einer neuen bei 769 nm liegenden Absorptionsbande der angeregten Potentialfläche S_j , sowie den beiden Bleichbanden bei 568 (Grundzustandsbleichbande) und 770 nm. Letztere ist mit der Fluoreszenz aus dem angeregten Zustand S_j identisch. Durch die Überlagerung dieser vier Banden löst sich die J -Bande als Zustand auf und wird zu einer Scheinbande. Der zeitliche Verlauf der stimulierten Emission und der Absorption im angeregten S_j -Zustand beschreiben den Zerfall der angeregten Bakteriorhodopsinmoleküle. Beide Kinetiken lassen sich nur schlecht mit einer Zeitkonstante (450 fs) beschreiben, sondern es werden zwei 370 fs und 2.1 notwendig, die in der Interpretation der Autoren als Grenzwerte für auftretende Zeitkonstanten anzusehen sind. Diese Vielfalt setzt eine große Anzahl an Spezies voraus, die sich aber auf der angeregten Potentialfläche spektroskopisch nicht unterscheiden dürfen und als Folge einer inhomogenen Grundzustandsbande beim Anregungsprozeß entstehen. Betrachtet man den K -Zustand, der mit nur einer Zeitkonstante von 3 ps entsteht und die Relaxation des Grundzustandsbleichsignals¹⁹⁸, für die ebenfalls nur eine Zeitkonstante angegeben wird (450 fs), dann wird der Schwachpunkt der vorgestellten Interpretation sichtbar. Sie könnte durch ein Experiment getestet werden. Dazu müßte der zeitliche Verlauf der Absorption und der stimulierten Emission von S_j bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit benötigt zur Erklärung der zeitabhängigen Spektren im Spektralbereich der Ethylenbande nach optischer Anregung keine Infrarotbande, die mit einem J -Zustand verknüpft ist. Unter Berücksichtigung der Korrelation der Ethylenbandenposition im optischen und infraroten Spektralbereich kann J als ein Grundzustand der elektronischen Grundzustandspotentialfläche S_0 deshalb ausgeschlossen werden. Nach optischer Anregung und einer Verzweigungsreaktion befinden sich nach 0.5 ps 40% der elektronisch angeregten Chromophore im elektronischen Grundzustand und liegen dort in schwingungsangeregter Form vor. Der anschließende Energielaxationsprozeß erfolgt innerhalb weniger Pikosekunden. Das belegen zeitaufgelöste Messungen der C=NH-Streckschwingungen¹⁹⁹ des Chromophors und die Ausführungen dieser Arbeit. Die Ergebnisse lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß die nach der strahlungslosen Verzweigung zum K -Intermediat weiter reagierenden 60% auch in schwingungsangeregter Form vorliegen.

4.3.5 Der Vergleich von Retinal in Proteinumgebung und in Lösung

Zum Schluß dieses Kapitels wird Retinal in Lösung mit der Klasse der Retinalproteine, vertreten durch Bakteriorhodopsin, Halorhodopsin und Rhodopsin verglichen, um den Einfluß der Proteinmatrix zu erörtern.

Halorhodopsin ist eine Chloridionenpumpe und neben Sensorhodopsin I und II auch in der Mem-

¹⁹⁶ Xu D. et al, Biophys. J. **70** (1996), 453

¹⁹⁷ Hasson K.C. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (1996), 15124

¹⁹⁸ Dexheimer S.L. et al, Chem. Phys. Lett. **188** (1992), 61

¹⁹⁹ Diller et al, Chem. Phys. Lett. **241** (1995), 109

Molekül	Primärkt.	Struktur	Homologie	Konfiguration
Rhodopsin (1)	Sehprozeß	BR ähnlich	10%	11-cis→all-trans
Bakteriorhodopsin	H ⁺ -Pumpe	BR	100%	all-trans→13-cis
Halorhodopsin (2)	Cl ⁻ -Pumpe	BR ähnlich	35%	all-trans→13-cis
Retinal in Ethanol (3)	---	Flüssigkeit	---	all-trans→13-cis+11-cis

Tabelle 9: Vergleich von Retinal in Lösung und Proteinumgebung bezüglich der sich ergebenden biologischen Funktion, der sich bildenden Struktur der Retinalumgebung, der Homologie der Aminosäuresequenz zu BR und der möglichen Konfigurationsformen des Retinals. "Ähnlich BR" bedeutet, daß das Protein aus sieben transmembranen α -Helices besteht, die eine ovale, polare Bindungstasche und ein Pseudo-Vakuum für das Retinal bilden, das über eine protonierte Schiff'sche Base an ein Lysin-Rest gebunden ist. (1) Tang L. et al, Isr. J. Chem. **35** (1995), 193; (2) Oesterhelt D., Isr J. Chem. **35** (1995), 475; Oesterhelt D., Biochemn. Intern. **18** (1989), 673; (3) Hamm P. et al, Chem. Phys. Lett. **263** (1996), 613

bran von *Halobacterium salinarium* zu finden.²⁰⁰ Sie dient dazu, Chloridionen in das Innere der Zelle zu pumpen. Dadurch wird ein Spannungsgradient aufgebaut, der den Flagellarmotor antreibt und somit Aminosäureaufnahme und Ionenaustausch ermöglicht. Letzteres ist auch wichtig um das osmotische Gleichgewicht zwischen dem Zellinneren und der sehr salzhaltigen Umgebung aufrecht zu erhalten. Rhodopsin kommt in den stäbchenförmigen Sehzellen vor und ist der Photorezeptor für den Sehprozeß von Tieren und Menschen.

Allen Molekülen ist gemeinsam, daß nach Lichtanregung eine Isomerisierung des Retinal-Cofaktors um eine C=C-Doppelbindung erfolgt. Betrachtet man insbesondere die Zeitkonstanten für den Übergang von $S_1 \rightarrow S_0$ und die Quanteneffizienz (Tabelle 10), dann zeigt sich, daß Halorhodopsin zwischen dem freien Retinal und Bakteriorhodopsin bzw. Rhodopsin einzuordnen ist.

Die Zuständigkeit der Proteinumgebung für die biologische Funktion ist nach Tabelle 9 ganz offensichtlich. Sehr deutlich zeigen das auch die Versuche von Sasaki et al²⁰¹, die Asp85 in Bakteriorhodopsin durch Threonin ersetzen und dadurch die Protonenpumpe in eine Chloridionenpumpe umwandeln. Der Versuch ist auch ein Beweis für den hohen funktionellen Verwandtheitsgrad von Halorhodopsin und Bakteriorhodopsin. Vergleicht man die möglichen und in Tabelle 9 zusammengefaßten Konfigurationszustände der Moleküle, dann zeigt sich daß die Gegenwart der Proteinmatrix den Konfigurationsraum einengt und stabilisiert. Von den drei möglichen Konfigurationszuständen des Retinals in Lösung bilden sich nämlich bei Anwesenheit der Proteinumgebung nur zwei aus. Die stabilisierende Wirkung zeigt sich insbesondere im Fall von Rhodopsin, das im Gegensatz zum freien Retinal 11-cis als Grundzustandskonfiguration besitzt.

Tabelle 10 drängt den Gedanken auf, daß eine schnelle Depopulation des angeregten Zustandes mit einer hohen Quanteneffizienz verknüpft ist. Das ist aber ein falscher Gedanke, denn die Potentialflächen, im Grund- und angeregten Zustand der betrachteten Moleküle sind verschieden.

²⁰⁰ Sensorrhodopsin I +II sind ebenfalls Retinalproteine. Sie dienen dem Bakterium als Photorezeptoren, die auf grünes (gesundes) und blaues (schädliches) Licht reagieren und damit die Zelle in Bereiche hoher Intensität grünen Lichtes steuern. Oesterhelt D., Vortragsmanuskript

²⁰¹ Sasaki J. et al, Science **269** (1995), 73

Molekül	Quanteneffizienz	VIS-Zeitkonstante	Schwingungszeitkonstante
Rhodopsin (7)	67% (all-trans)	0.2 ps	< 6 ps
Bakteriorhodopsin	64% (13-cis)	0.5ps / 0.37ps+2.1ps	2.5±1 ps (1) 1.9 ps (2) 0.7ps+2ps (3)
Halorhodopsin (6)	32% (13-cis)	1.5ps + 8.5ps	---
Retinal in Ethanol (5)	20% (11-cis) 6% (13-cis)	2ps + 7.2ps	2 ps < τ_{R} < 7.2 ps (4)

Tabelle 10: Vergleich von Retinal in Lösung und Proteinumgebung bezüglich der Quanteneffizienz für den Produktzustand, der optischen Zeitkonstanten für den Zerfall des angeregten Zustandes und der Zeitkonstanten für die Schwingungsrelaxation des Grund- und Produktzustandes. (1) Zeitkonstante für die Relaxation des Antistokes Resonanz-Raman Signales der Ethylenbande von *BR* und *K*, Doig S.J. et al, J. Phys. Chem. **95** (1991), 6372; (2) Zeitkonstante für die Relaxation der C=NH-Streckschwingung im Grundzustand, Diller R. et al, Chem. Phys. Lett. **241** (1995), 109; (3) **Zeitkonstanten für den $v=1 \rightarrow 2$ und $v=0 \rightarrow 1$ Übergang der Ethylenbande im Grundzustand, Diese Arbeit**; (4) Hamm P. et al, Chem. Phys. Lett **268** (1997), 180; (5) Hamm P. et al, Chem Phys. Lett **263** (1996), 613; (6) Arlt T. et al, Chem. Phys. Lett. **241** (1995), 559; (7) Peteanu L.A. et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA **90** (1993), 11762; Wang Q. et al, Science **266** (1994), 422

Experimentell wird dieser Unterschied durch Mutantenstudien²⁰² belegt, die im Fall von Rhodopsin einen Zusammenhang zwischen betrachteter Zeitkonstante und Quanteneffizienz belegen und im Fall von Bakteriorhodopsin widerlegen.

Trotz der unterschiedlichen Dynamik und biologischen Funktion der betrachteten Moleküle sind die Zeitkonstanten für die Relaxation schwingungsangeregter Normalmoden des Grundzustandes ähnlich (Tabelle 10). Die Relaxationszeit wird durch die miteinander in Konkurrenz stehenden Zerfallskanäle bestimmt.²⁰³ Schnelle intramolekulare (innermolekulare) Energieumverteilung oder schnelle intermolekulare (zwischenmolekulare) Energieumverteilung bieten sich als Grenzfälle an. Liegt eine starke Kopplung der Normalmoden des Chromophors vor, dann kommt es auf Grund der Größe des Cofaktors und der damit einhergehenden großen Zustandsdichte²⁰⁴ zu einer schnellen Energieumverteilung (IVR)²⁰⁵ innerhalb der Chromophormoden. Es läßt sich eine Chromophortemperatur definieren. Die Abkühlung wird dann durch die Ankopplung an das Bad, gebildet durch die Normalmoden der Proteinmatrix oder des Lösungsmittels bestimmt. Ist dagegen die Kopplung der Chromophormoden untereinander deutlich kleiner als die Kopplung an die Badmoden, dann liegt der zweite Grenzfall der schnellen intermolekularen Energieumverteilung (EVR)²⁰⁶ vor. Es kommt zu einer modenselektiven Energierelaxation. Nachdem Ethanol und die Bindungstasche in

²⁰² Schoenlein R.W. et al, J. Phys. Chem. **97** (1993), 12087; Suzuki T. et al, Biophys. J. **34** (1981), 261; Logunov S.L. et al, J. Phys. Chem. **100** (1996), 2391; Song L. et al, Science **261** (1993), 891; Song L. et al, J. Phys. Chem. **100** (1996), 10479; Logunov S.L. et al, Biophys. J. **70** (1996), 2875

²⁰³ Seilmeier A., in Kaiser W., *Ultrashort Laser Pulses*, Topics in Appl. Phys. **60** (1992), 2. Aufl, 279 ff

²⁰⁴ Für Naphthalin ist bei einer Energie von 3000 cm⁻¹ über dem Grundzustand die Zustandsdichte ca. 100 / cm⁻¹.

²⁰⁵ Internal Vibrational Relaxation

²⁰⁶ External Vibrational Relaxation

den Proteinmatrizen polar sind, könnte diese Eigenschaft den Kopplungsmechanismus bilden.²⁰⁷ Es wird aber zukünftigen Experimenten vorbehalten bleiben, zwischen IVR oder EVR zu unterscheiden.

²⁰⁷ Hamm P. et al, Chem. Phys. Lett. **263** (1996), 613

