

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie der Ethylenbande des Bakteriorhodopsins (1498 cm^{-1} - 1542 cm^{-1}). Die Bande wird von symmetrischen Streckschwingungen der C=C-Doppelbindungen des Chromophors gebildet. Die Bandenposition ist mit dem Grad der p-Elektronen-Delokalisierung entlang der Doppelbindungen verknüpft. Die trans-cis Isomerisierung des Chromophors nach optischer Anregung verändert die Wechselwirkung des p-Elektronensystems mit der polaren Umgebung der Bindungstasche und damit indirekt auch die Bandenposition der Ethylenbande. Sie kann deshalb als Sonde für den zu untersuchenden Isomerisierungsprozeß betrachtet werden.

Nachdem kommerziell kein Subpikosekundenlaser mit dem notwendigen Spektralbereich (1498 cm^{-1} - 1542 cm^{-1}) zu erwerben war, mußte eine geeignete Meßapparatur geschaffen werden. In einem ersten Schritt wurde ein selbstgebauter CO-Laser in ein kommerzielles Femtosekundenlaser-System integriert. Unter Verwendung des optischen "gatings" als Detektionsmethode konnte dann in einem zweiten Schritt ein Subpikosekunden-Infrarot-Absorptionsspektrometer realisiert werden. Derzeit können Absorptionsänderungen von 1 mOD mit einer Zeitauflösung von 0.6 ps detektiert werden. Der spektral abtastbare Bereich wird durch den CO-Laser bestimmt und erstreckt sich gegenwärtig von 1458 cm^{-1} - 1942 cm^{-1} .

Damit ist die Grundlage gelegt, um die Ethylenbande von Bakteriorhodopsin spektral und zeit- aufgelöst zu vermessen. Die experimentellen Ergebnisse weisen eine zeitliche Grob- und eine zeitliche Feinstruktur auf.

Die zeitliche Grobstruktur konnte durch ein einfaches phänomenologisches Modell beschrieben werden. Es besteht aus einem Ratenmodell zur Berechnung der zeitabhängigen Besetzungen der beteiligten Zustände, die teilweise eine direkte spektroskopische Relevanz durch Verknüpfung mit lorentzförmigen Banden erlangt haben. Es zeigte sich, daß vier energetisch nicht gekoppelte Banden (Grundzustandsbande, erster angeregter Zustand, *K-Dublette*) für eine zufriedenstellende Beschreibung notwendig waren. Das Modell stützt die von A.B. Myers²⁰⁸ vorläufig vorgenommene Obertonzuordnung der Ethylenbande, aus der sich der erste angeregte Schwingungszustand mit einer spektralen Position von 1510 cm^{-1} ableiten läßt. Zusätzlich liefert es obere Grenzen für die Zeitkonstanten der Bevölkering des angeregten Zustandes (0.67 ps) und der Relaxation des Grundzustandes (2 ps), sowie die relativen Extinktionskoeffizienten für die *K-Dublette* von 0.7 (1519 cm^{-1}) und 0.3 (1530 cm^{-1}). Ein Vergleich des gemessenen *BR-K-Differenzspektrums* bei 12 ps mit Tieftemperatur (77 K)-FTIR-Messungen aus der Literatur zeigt eine sehr gute Übereinstimmung und belegt auf direkte Art und Weise, daß der *K*-Zustand bezüglich der Ethylenbande ein kalter Schwingungszustand (=Grundzustand) ist. Aus den Differenzspektren ließen sich zeit- abhängige integrale Absorptionsänderungen ableiten, welche mit den Besetzungszahlen und den Extinktionskoeffizienten auf sehr einfache Weise verbunden sind. Aus der verschwindenden Absorptionsänderung zu späteren Zeiten (20 ps) konnte unter Annahme der Erhaltung der Gesamtbesetzungszahl die Gleichheit der Oszillatorstärken für den Grundzustand und das *K*-Intermediat abgeleitet werden.

Als zeitliche Feinstruktur wird der Nachschwinger im Bleichsignal bezeichnet, der besonders deutlich bei der Kinetik der 1529 cm^{-1} -Bande zu Tage tritt. Er verändert die Werte der abgeleiteten Zeitkonstanten der Relaxation, die deswegen eine obere Grenze darstellen. Eine Vielzahl an möglichen experimentellen Fehlerquellen konnte ausgeschlossen werden. Eine zusätzliche Mes-

²⁰⁸ Myers A.B. et al, J. Chem. Phys. 79 (1983),603

sung mit veränderter Probe legt einen Einfluß der Quartärstruktur nahe. Die Klärung, ob es sich um einen wirklichen physikalischen Effekt oder ein Meßartefakt handelt, wird aber einer zukünftigen systematischen Untersuchung vorbehalten bleiben.

Die Ergebnisse lassen sich in einen größeren Rahmen einbetten. Aus biophysikalischer und chemischer Sicht ist die Frage nach der Existenz und der Natur des J -Intermediates relevant. Vier Vorstellungen sind in der Literatur zu finden, nämlich J als lokales Minimum, also einen Grundzustand der Grundzustandspotentialfläche S_0 , J als schwingungsangeregtes, sogenanntes heißes K , J als Polarisationsecho und J als Scheinzustand. Obwohl es im Ratenmodell einen J -Zustand gibt, war zur Erklärung der zeit- und wellenzahlabhängigen Kinetiken eine Verknüpfung mit einer Bande nicht notwendig, weshalb auf Grund der vorliegenden Messungen J als ein Grundzustand ausgeschlossen werden kann. Nachdem bei der Rückrelaxation nach optischer Anregung in den elektronischen Grundzustand ein schwingungsangeregter Chromophor entsteht, ist es sehr wahrscheinlich, daß bei der Vorwärtsreaktion zum K -Zustand ebenfalls ein schwingungsangeregter Chromophor vorliegt.

Aus makromolekülphysikalischer Sicht besteht Bakteriorhodopsin aus einem Retinal, das von einer Proteinmatrix umgeben wird. Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelte Schwingungsrelaxationszeit der Ethylenbande nach optischer Anregung mit der entsprechenden Relaxationszeit für die C=NH-Streckschwingung und Ergebnissen von Antistokes-Resonanz-Raman-Messungen anderer Autoren, dann erhält man eine gute Übereinstimmung. Überraschend ist dagegen, daß die Relaxationszeiten von Bakteriorhodopsin, Rhodopsin, Halorhodopsin und Retinal in Ethanol ähnlich sind. Als wahrscheinliche Ursache ist die in allen vier Fällen vorliegende polare Umgebung anzusehen. Diese Hypothese könnte insbesondere im Bezug auf Bakteriorhodopsin durch zeitaufgelöste Messungen an Schwingungsbanden, die polaren Aminosäuren zugeordnet sind, gemessen werden.

Um die Experimente auch auf Bereiche außerhalb der Ethylenbande von Bakteriorhodopsin ausweiten zu können, muß das Rauschen der Meßapparatur weiter vermindert werden. Gegenüber den ersten Experimenten konnte durch Verbesserungen im Detektionsbereich und durch Optimierung der Datenerfassung ein Faktor 20 erreicht werden. Ein weiterer Faktor 10 wäre wünschenswert. Die Erhöhung der Repetitionsrate von 1 kHz auf 5 kHz wäre ein Schritt in diese Richtung. Ebenso alle Maßnahmen zur Erhöhung der vom Photomultiplier detektierbaren Photonenzahl. Befürchtungen, dadurch in den schwach nichtlinearen Bereich des Detektors vorzustoßen, können durch die zu messenden und im Bereich von wenigen mOD liegenden Absorptionsänderungen zerstreut werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die optische Anregung verwendet, um Normalmoden des elektronischen Grundzustandes des Chromophors anzuregen. Nachfolgende Energieflüsse können auf diese Art und Weise untersucht werden. Allerdings besteht bei einem Versuch die Meßergebnisse dieser Art von Experimenten zu simulieren immer eine Wissenslücke in Form einer unbekanntenen Ausgangsbesetzungsverteilung beteiligter Schwingungszustände. Sie könnte durch eine andere Art von Experimenten geschlossen werden, die zur Anregung "gechirpte" oder Mehrfachinfrarotpulse verwendet, um so eine definierte Anfangsbesetzungsverteilung zu präparieren. Theoretische Rechnungen und erste Experimente²⁰⁹ wurden schon von anderen Arbeitsgruppen gemacht. Die Erzeugung und Steuerung einer in Grenzen beliebig vorgegebenen Besetzungsverteilung und Einbettung in Experimente, deren Ziel das Studium der Dynamik von Energieflüssen und Kopp-

²⁰⁹ Melinger J.S. et al, Phys. Rev. A **51** (1995),3366; Korolkov M.V. et al., J. Phys. Chem. **100** (1996), 13927; Paramonov G.K., Chem. Phys. **177** (1993), 169; Just B. et al, Chem. Phys. Lett **193** (1992),423; Just B. et al, Chem. Phys. Lett. **193** (1992),429; Arrivo S.M. et al, Chem. Phys. Lett. **235** (1995),247; Kleiman V. D. et al, to be published in Special Issue "Coherent Spectroscopy" of Chem. Phys. (1998)

lungsmechanismen ist, wartet noch auf eine Realisierung.