

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

### ***4.1 Halorhodopsin***

Die Primärreaktion der lichtgetriebenen Chloridionen-Pumpe Halorhodopsin wurde mittels zeitaufgelöster Infrarot-Schwingungsspektroskopie untersucht. Aus Messungen mit optischer fs-Spektroskopie ist bekannt, dass die Dynamik der Primärreaktion durch drei Zeitkonstanten 8.5(1.5) ps und 1.5(7) ps und 170(70) fs bestimmt wird [Arlt1995]. Eine eindeutige Zuordnung einer Zeitkonstante für den reaktiven Pfad zum  $HR_K$  konnte bis dahin noch nicht getroffen werden. Im Speziellen soll daher in dieser Arbeit die Zeitkonstante für die 13-cis ( $HR_K$ )-Produktentstehung diskutiert werden (Kapitel 4.2.2.4). Das Absorptionsmaximum für  $HR_K$  wird mit 600 nm angegeben ( $HR_{600}$ ) [Arlt1995], es finden sich jedoch auch Werte von 630 nm [Weber1981]. Diese Zahl variiert in der Literatur, was u. a. daran liegt, dass manchmal das Absorptionsmaximum des Differenzspektrums  $HR_{578} - HR_K$  gemeint ist oder das Maximum des unter Berücksichtigung der Quantenausbeute errechneten Absolutspektrums von  $HR_K$ . Das  $HR_K$ -Intermediat, das auch in [Kandori1992] beobachtet wurde, existiert nach [Polland1985] mindestens 2 ns.

Die Messungen mit optischer fs-Spektroskopie zeigen nicht eindeutig, ob das Auftreten von zwei Zeitkonstanten aus einer Verzweigungsreaktion in zwei Reaktionskanäle auf der  $S_1$ -Oberfläche oder aus einer heterogenen Grundzustandsverteilung resultiert (siehe Kapitel 1.1). Um diese offene Frage zu klären, haben wir in Kapitel 4.2.3 den Einfluss der Spezies aus dem Grundzustand mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration des Retinalchromophors auf unsere Messungen untersucht.

Gegenstand weiterer Untersuchungen ist neben der Isomerisierung des Retinalchromophors die Dynamik im elektronisch angeregten Zustand und die Proteindynamik.

#### **4.1.1 Vergleichbarkeit von HR-Filmen und HR-Suspensionen**

Die Dynamik der Primärreaktion von HR wurde bisher an HR-Suspensionen mit fs-Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich untersucht [Arlt1995]. Der Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes ist dabei biphasisch mit den beiden Zeitkonstanten

8.5(1.5) ps und 1.5(7) ps. Eine dritte, ultrakurze Zeitkomponente von 170(70) fs wird beobachtet und einer gedämpften Bewegung im elektronisch angeregten Zustand zugewiesen. In unseren Experimenten verwendeten wir hydratisierte HR-Filme (siehe Kapitel 3.3). Es stellt sich somit die Frage, ob HR-Filme mit HR-Suspensionen in Bezug auf die Dynamik der Primärreaktion und den dabei beobachtbaren Zeitkonstanten vergleichbar sind. Daher haben wir vorbereitend an den HR-Filmen optische fs-Spektroskopie durchgeführt. Die Anregungswellenlänge lag bei 570 nm, geprobt wurde bei den Wellenlängen 490 nm, 570 nm und 687 nm.

#### 4.1.1.1 VIS-VIS-Spektroskopie an HR-Filmen

Die Pulsdauer von Pump- und Probepuls betrug jeweils 35 fs. Hieraus errechnet sich eine Systemantwort von 50 fs. Die Pulsenergie des Pumpulses lag bei maximal 0.6  $\mu\text{J}/\text{Puls}$ . Die Pulsenergie des Probepulses wurde auf den zehnten Teil der Pulsenergie des Pumpulses eingestellt.

Bei 490 nm absorbiert der elektronisch angeregte Zustand, bei 570 nm zeigt sich das Bleichsignal des Grundzustandes, und bei 687 nm beobachtet man stimulierte Emission. In Abb. 4.1 ist die Transiente bei einer Probewellenlänge von 570 nm dargestellt. Sie wurde biexponentiell gefittet. Das Bleichsignal des Grundzustandes zerfällt mit den beiden Zeitkonstanten 7(1) ps und 1.3(2) ps.

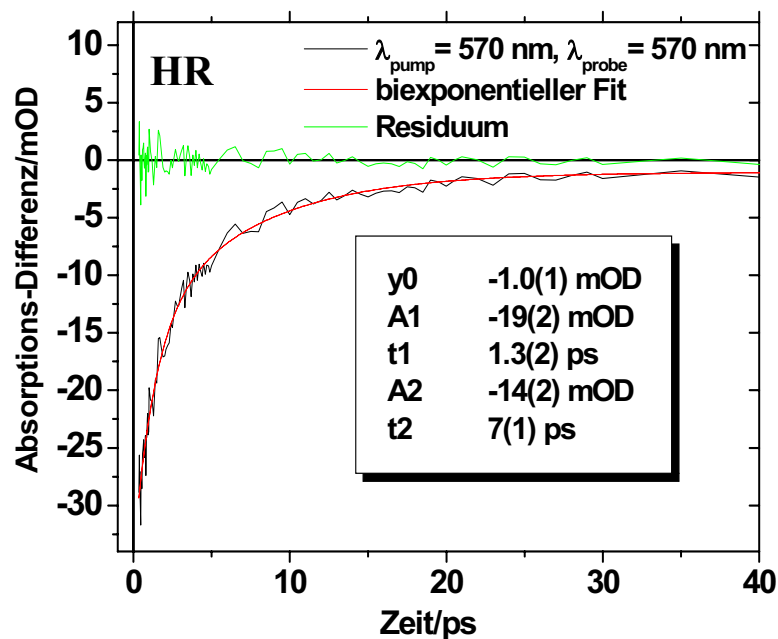


Abbildung 4.1: HR-Film: Zerfall des Bleichsignals bei einer Probewellenlänge von 570 nm.

Abb. 4.2 zeigt die Transiente bei einer Probewellenlänge von 490 nm. Bei dieser Probewellenlänge beobachtet man den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes. Das Signal zerfällt biexponentiell mit 6.8(7) ps und 1.4(2) ps.

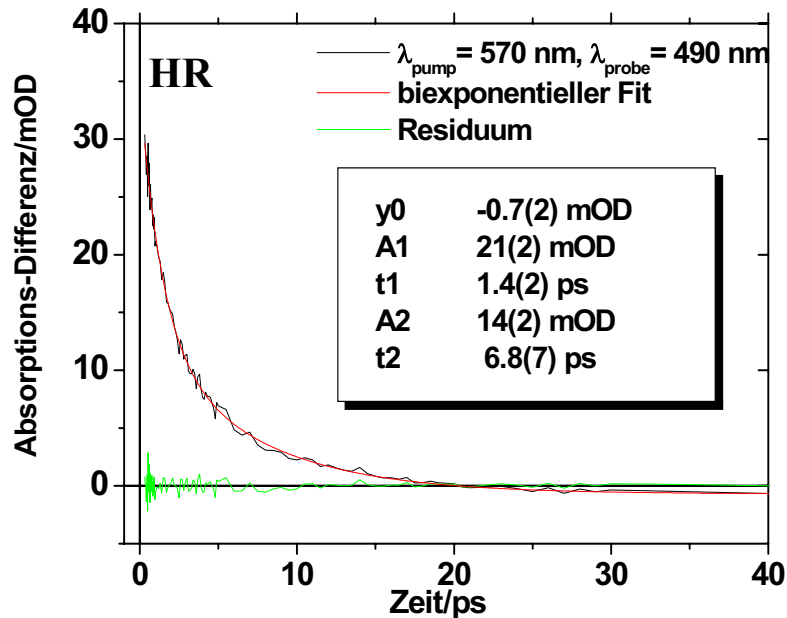


Abbildung 4.2: HR-Film: Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes bei einer Probewellenlänge von 490 nm.

In Abb. 4.3 ist die Transiente bei einer Probewellenlänge von 687 nm wiedergegeben. Es wird stimulierte Emission beobachtet. Der Zerfall ist hier triexponentiell mit den Zeitkonstanten 6(2) ps, 1.8(7) ps und 0.3(1) ps.

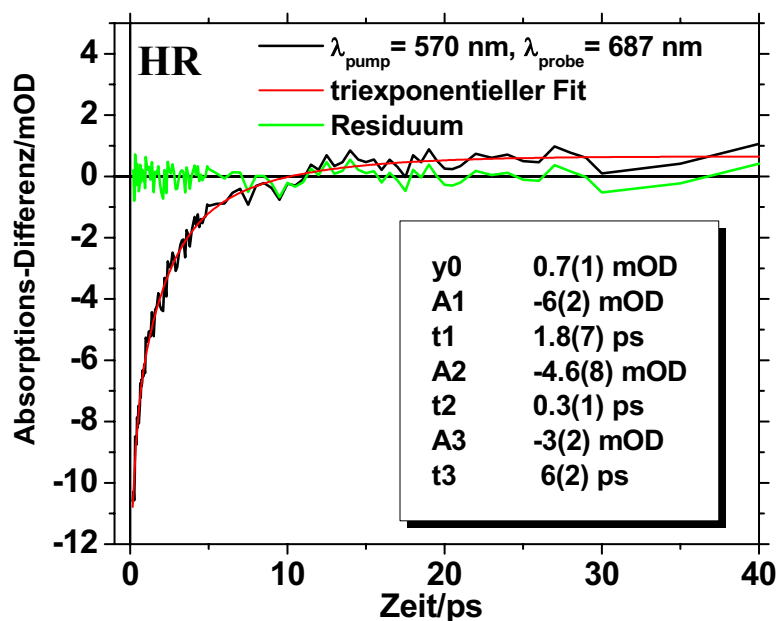


Abbildung 4.3: HR-Film: Stimulierte Emission bei einer Probewellenlänge von 687 nm.

Die Dynamik der Absorptionsänderungen kann also durch die gemittelten Zeitkonstanten: 6.6(8) ps, 1.5(3) ps und 0.3(1) ps modelliert werden. Diese Zeitkonstanten sind zu denen aus den Messungen an HR-Suspensionen [Arlt1995]: 8.5(1.5) ps, 1.5(7) ps und 170(70) fs gleich. Durch die unterschiedliche Probenpräparation wird daher die Dynamik der Primärreaktion nicht geändert.

#### **4.1.2 Photoinduzierte Primärreaktion von HR-Filmen untersucht durch fs-VIS-IR-Spektroskopie**

Die lichtinduzierte Primärreaktion von Halorhodopsin aus dem Bakterium *Halobacterium Salinarum* wurde mittels hochzeitaufgelöster IR-Schwingungsspektroskopie untersucht. Dabei werden die zeitliche Entwicklung von Infrarot-Produktbanden und Eduktbanden Aufschluss geben über die Isomerisierung des Retinalchromophors, die Dynamik des elektronisch angeregten Zustandes und die Proteindynamik. Die IR-Absorptionsdifferenzen zwischen gepumpter und ungepumpter Probe wurden im Bereich der C-C-Streckschwingungen („Fingerprintbereich“), C=C-Streckschwingungen („Ethylenbereich“) und der C=ND-Streckschwingung („Schiffsche Base-Bereich“) des Retinalchromophors aufgenommen. Daraus ergeben sich Transienten und zeitaufgelöste IR-Differenzspektren. Um ein vollständiges Modell zur Primärreaktion zu entwickeln, muss untersucht werden, mit welchen Zeitkonstanten sich Produkt- und Eduktbanden entwickeln.

##### **4.1.2.1 Übersichtsspektren von 950 cm<sup>-1</sup> bis 1700 cm<sup>-1</sup>**

Es wurden IR-Übersichtsspektren über einen großen Frequenzbereich aufgenommen. Mithilfe dieser Absorptionsdifferenzspektren zu wenigen ausgewählten Zeitpunkten verschafft man sich einen schnellen Überblick sowohl über die Dynamik aller Produkt- und Eduktbanden als auch über spektrale Besonderheiten. Die Spektren wurden mit zwei HR-Proben gemessen und gemittelt. In Abb. 4.4 sind die Übersichtsspektren zu den Zeitpunkten 150 fs, 3.5 ps und 25 ps dargestellt. Positive Banden sind Produktbanden, negative Banden entsprechen Eduktbanden. Die spektralen Bereiche der C-C-Streckschwingungen („Fingerprintbereich“):

1135  $\text{cm}^{-1}$  – 1230  $\text{cm}^{-1}$ , der C=C-Streckschwingungen („Ethylenbereich“): 1450  $\text{cm}^{-1}$ -1600  $\text{cm}^{-1}$  und der C=NH-Streckschwingung („Schiffsche Base-Bereich“): 1600  $\text{cm}^{-1}$  - 1700  $\text{cm}^{-1}$  und der Bereich der „hydrogen-out-of-plane“-Schwingungen („HOOP-Bereich“) um 970  $\text{cm}^{-1}$  sind hervorgehoben. Der instantanen, positiven Absorptionsdifferenz im 150 fs Spektrum sind Schwingungsbanden im elektronisch angeregten Zustand zuzuordnen. Im 25 ps-Spektrum zeigt sich im Fingerprintbereich das charakteristische Muster<sup>1</sup> für die

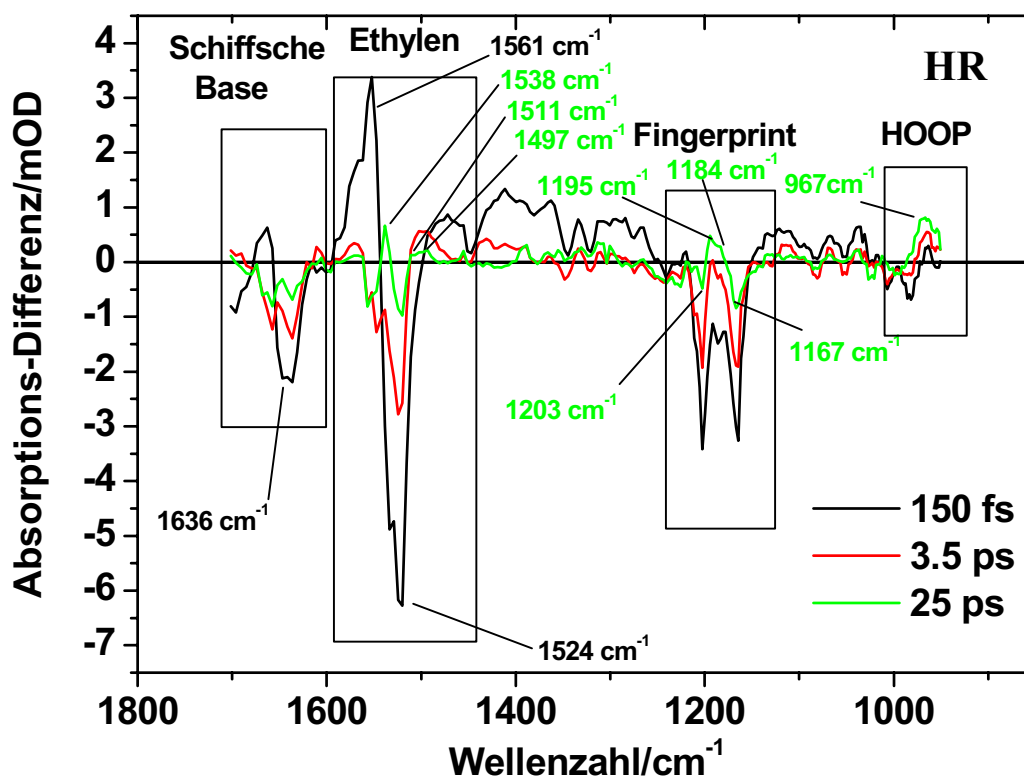


Abbildung 4.4: IR-Differenz-Übersichtsspektren von HR zu 150 fs, 3.5 ps und 25 ps.

<sup>1</sup> In Braiman et al. [Braiman1982] wurden Tieftemperatur-Resonanz-Raman (RR)-Messungen bei 77 K an bR durchgeführt. Dabei konnten die charakteristischen Merkmale des Schwingungsspektrums des Retinalchromophors in 13-cis-Konfiguration (K-Intermediat) bestimmt werden. Der 13-cis-Konfiguration ordnete man drei Banden bei 957  $\text{cm}^{-1}$ , 1195  $\text{cm}^{-1}$  und 1519  $\text{cm}^{-1}$  zu. Der Bande bei 1195  $\text{cm}^{-1}$  entspricht die C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Streckschwingung des Retinalchromophors in 13-cis-Konfiguration. Smith et al. [Smith1987] haben Normalmodenberechnungen für bR durchgeführt. Damit konnten sie den mit RR-Untersuchungen gemessenen Linien bestimmte Schwingungsmoden zuordnen. Die RR-Linie bei 1201  $\text{cm}^{-1}$  gehört zur C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>- und die RR-Linie bei 1169  $\text{cm}^{-1}$  zur C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>-Streckschwingung des Retinalchromophors in all-trans-Konfiguration. Bei einem Konfigurationswechsel des Retinalchromophors von all-trans zu 13-cis zeigt sich in 15 ns-step-scan FTIR-bR-K-Spektren [Rodig1999] das charakteristische Muster einer positiven Bande bei 1192  $\text{cm}^{-1}$  flankiert von zwei negativen Banden bei 1167  $\text{cm}^{-1}$  und 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Da die Homologie zwischen bR und HR recht groß ist (36% im Transmembranbereich [Váró2000]), wird die Zuordnung der Banden für HR aus den Messungen/Normalmodenberechnungen für bR entlehnt. FTIR-Messungen an bR zeigen für das K-Intermediat vergleichbare Bandenpositionen [Gerwert1986].

13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors<sup>1</sup>. Im 3.5 ps – Spektrum ist dieses Muster schon vollständig ausgeprägt. Im Kapitel 4.1.2.2 wird näher auf die einzelnen Banden eingegangen.

#### 4.1.2.2 Zuordnung der Schwingungsbanden: Isomerisierung, Dynamik des elektronisch angeregten Zustandes und Proteindynamik

Um den Schwingungsbanden aus Abb. 4.4 einzelne Schwingungsmoden zuzuordnen, können Resonanz-Raman-Spektren und FTIR-Spektren von HR herangezogen werden. Bei der Resonanz-Raman-Methode findet eine Resonanzverstärkung nur derjenigen Schwingungsübergänge statt, die an den elektronischen Übergang gekoppelt sind. Daher zeigen sich in den Resonanz-Raman-Spektren vorwiegend Chromophorbanden und keine Proteinbanden<sup>1</sup>. Banden, die also in der fs-VIS-IR-Spektroskopie zu sehen sind, aber nicht in den Resonanz-Raman-Spektren, deuten z. B. auf Amid-I oder Amid-II Banden des Proteins,

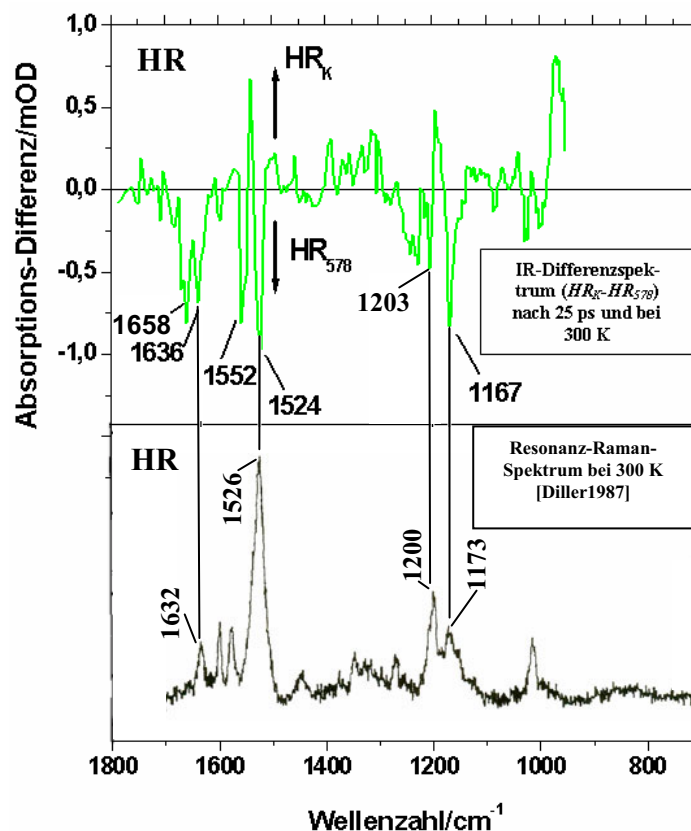


Abbildung 4.5: IR-Differenzspektrum ( $HR_K - HR_{578}$ ) nach 25 ps und RR-Spektrum von  $HR_{578}$  bei 300 K [Diller1987].

Wasser-Banden oder Aminosäuren hin. In Abb. 4.5 ist ein Resonanz-Raman-Spektrum

<sup>1</sup> Bei Molekülen mit gebrochener Symmetrie sind die Auswahlregeln teilweise aufgehoben. Somit werden in Raman- und IR-Spektren die gleichen Schwingungsmoden beobachtet. Bei kleinen, symmetrischen Molekülen hingegen sind durch die strengen Auswahlregeln die IR- und die Raman-Spektren komplementär.

[Diller1987](unten) im direkten Vergleich zum IR-Differenzspektrum (HR<sub>K</sub>-HR<sub>578</sub>) nach 25 ps bei 300 K (oben) gezeigt.

### **Zuordnung der Eduktbanden**

Vergleicht man nun in Abb. 4.5 die negativen Edukt-Banden des IR-Differenzspektrums mit den Resonanz-Raman Banden, so ergeben sich an vielen Stellen Übereinstimmungen. Die Banden im Fingerprintbereich bei 1167 cm<sup>-1</sup> und 1203 cm<sup>-1</sup> korrespondieren mit den RR-Banden bei 1173 cm<sup>-1</sup> und 1200 cm<sup>-1</sup><sup>1</sup>. Beim bR wird der Bande bei 1169 cm<sup>-1</sup> die C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>-Streckschwingung des Retinalchromophors zugeordnet, und die Bande bei 1201 cm<sup>-1</sup> wird durch die C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Streckschwingung bestimmt [Smith1984] [Smith1987]. Die Ähnlichkeit zum bR-Spektrum legt nahe, auch beim HR diesen Banden die entsprechenden Schwingungsmoden zuzuordnen. Im 150 fs-Spektrum in Abb. 4.4 zeigt sich bei 1186 cm<sup>-1</sup> eine negative Eduktbande. In [Zimányi1997] ist in den FT-Raman-Spektren eine Edukt-Bande bei 1186 cm<sup>-1</sup> zu sehen. Sie wird zwei Spezies aus dem Grundzustand mit all-trans- und (13-cis, 15-syn)-Konfiguration des Chromophors zugeordnet.

Beim bR wird der Bande bei 1529 cm<sup>-1</sup> eine Ethylenstreckschwingung über mehrere zentrale, in-Phase schwingende C=C-Doppelbindungen (C<sub>9</sub> - C<sub>14</sub>) des Retinalchromophors zugewiesen [Curry1982] [Saito1983] [Curry1984]. Die negative Bande im Ethylenbereich in Abb. 4.5 bei 1524 cm<sup>-1</sup>, die sowohl in unseren IR-Differenzspektren als auch im RR-Raman-Spektrum (1526 cm<sup>-1</sup>) vorkommt<sup>2</sup>, entspricht derselben Zuordnung [Smith1984] [Alshuth1985] [Diller1987]. Die kleinere Absorptionsfrequenz der Ethylenstreckschwingung im Vergleich zum bR kann mit einer verminderten Lokalisierung der  $\pi$ -Elektronen in Doppelbindungen beim HR erklärt werden, das sich auch im größeren Absorptionsmaximum des HR im Vergleich zum bR widerspiegelt [Rimai1973][Aton1977] [Stockburger1979][Massig1982][Smith1984][Alshuth1985].

Die RR-Bande bei 1632 cm<sup>-1</sup><sup>3</sup> bzw. die IR-Differenzbande bei 1636 cm<sup>-1</sup> wird der C<sub>15</sub>=NH<sup>+</sup>- Streckschwingung der Schiffischen Base zugeordnet. Wenn HR in D<sub>2</sub>O anstatt in H<sub>2</sub>O suspendiert wird, verschiebt sich die Bande von 1636 cm<sup>-1</sup> auf 1622 cm<sup>-1</sup>. In Abb. 4.6 ist das 25 ps-IR-Differenzspektrum im Schiffischen Base-Bereich einer in H<sub>2</sub>O suspendierten und einer in D<sub>2</sub>O suspendierten HR-Probe gezeigt. Diese Verschiebung zeigt sich auch in Resonanz-Raman-Messungen [Alshuth1985][Maeda1985][Diller1987] und wird als ein

<sup>1 2 3</sup> Bei Ames et al. lagen die Eduktbanden bei 1170 cm<sup>-1</sup>, 1204 cm<sup>-1</sup>, 1524 cm<sup>-1</sup> und 1633 cm<sup>-1</sup> (RR-Spektrum bei 300 K).

Beweis angesehen, dass die Bande bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  zur  $\text{C}_{15}=\text{NH}^+$ -Streckschwingung gehört. Interessanterweise ist beim HR die Verschiebung bei einer deuterierten Schiffischen Base kleiner als beim bR ( $17\text{ cm}^{-1}$  [Alshuth1985]). Auch ist die Frequenz der  $\text{C}_{15}=\text{NH}^+$ -Streckschwingung beim HR  $9\text{ cm}^{-1}$  kleiner als beim bR [Diller1987]. Diese Unterschiede lassen sich aus einer Kopplung der  $\text{C}_{15}=\text{NH}^+$ -Streckschwingung an die in der Ebene liegende N-H-Biegeschwingung des Retinalchromophors erklären: Je stärker diese Kopplung ist, desto größer ist die Verschiebung der  $\text{C}_{15}=\text{NH}^+$ -Bande zu höheren Frequenzen. Bei Deuterierung der Schiffischen Base kommt zu der Verschiebung der Frequenz aufgrund des Masseneffektes noch eine Verschiebung hinzu, die von der Stärke der C=N/N-H-Kopplung

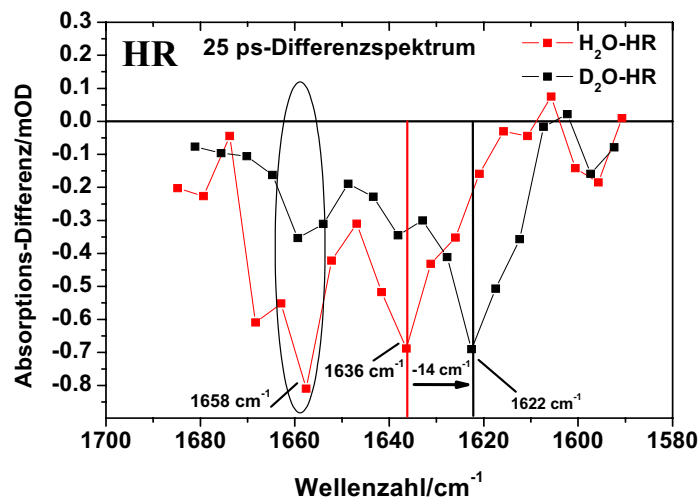


Abbildung 4.6: 25 ps-IR-Differenzspektrum einer  $\text{D}_2\text{O}$ - und einer  $\text{H}_2\text{O}$ -HR-Probe.

herrührt. Die kleine Deuteriumverschiebung von  $14\text{ cm}^{-1}$  beim HR impliziert, dass die C=N/N-H-Kopplung beim HR sehr klein ist und die Verschiebung sich fast allein aus der Massendifferenz ergibt, die beim Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium ca.  $10\text{ cm}^{-1}$  beträgt [Aton1980][Argade1981].

Auffallend in den Spektren aus Abb. 4.6 ist die negative Bande bei  $1658\text{ cm}^{-1}$ . Bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  absorbieren die C=O-Streckschwingungen des Peptidgerüsts: Amid-I-Bande [Smith1987]. Auch käme für diese Bande die Biegeschwingung eines Wassermoleküls, das durch die Umlegung der Schiffischen Base bei Isomerisierung verschoben wird, in Frage. Wasser in der Nähe der Chromophorbindingstelle wird jedoch nicht der einzige Grund für diese Bande sein, denn bei Substitution von  $\text{H}_2\text{O}$  gegen  $\text{D}_2\text{O}$  (Kapitel 3.3.2) bleibt eine in Relation zur C=ND-Bande bei  $1622\text{ cm}^{-1}$  kleine, negative Bande bei  $1658\text{ cm}^{-1}$  übrig (Abb. 4.6). Aminosäuren absorbieren auch um  $1660\text{ cm}^{-1}$ .

Im 25 ps -IR-Differenzspektrum in Abb. 4.5/oben liegt bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  eine negative



Bande. Man kann dieser Bande die Amid-II-Bande, also C-N-Streckschwingungen des Peptidgerüsts, zuordnen [Hackmann2001][Herbst2002/I].

### Zuordnung der Produktbanden

Zur Identifizierung der Produktbanden des K-Zustandes  $HR_K$ , also den positiven Banden in den IR-Differenzspektren zu späten Zeiten (25 ps) (Abb. 4.4), soll auf Spektren aus der Fourier-Transform-Infrared-Methode (FTIR) zurückgegriffen werden<sup>1</sup>. Zusätzlich sieht man in FTIR-Spektren Eduktbanden, die nicht vom Retinalchromophor herrühren. Bei den statischen Tieftemperatur-FTIR-Spektren ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit mit unseren IR-Messungen bei 300 K zu berücksichtigen. Durch die tiefe Temperatur könnte sich z. B. das Protein verändern.

In Abb. 4.7 ist ein statisches Tieftemperatur FTIR-Spektrum von  $HR_K$ - $HR_{578}$  bei 81 K [Rothschild1988] (unten) zusammen mit dem IR-Differenzspektrum zu 25 ps bei 300 K (oben) gezeigt<sup>2</sup>. Die HOOP-Bande bei  $967\text{ cm}^{-1}$  taucht in beiden Spektren auf. Sie stammt von der  $C_{15}$ -HOOP-Mode des Retinalchromophors [Rothschild1988][Dioumav1997]. Die HOOP-Bande indiziert, dass der Retinalchromophor im K-Zustand stark verdrillt ist [Fahmy1989][Fahmy1991][Hackmann2001]. Diese Bande verschwindet erst wieder im  $HR_L$ -Zustand nach mehreren 100  $\mu\text{s}$ , wenn die Verdrillung wieder in eine planarere Konfiguration des Chromophors übergeht. Die positive Bande bei  $1195(3)\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1199(2)\text{ cm}^{-1}$  wird in beiden Spektren beobachtet<sup>3</sup>. Im „Fingerprintbereich“, also im spektralen Bereich der C-C-Streckschwingungen zeigt sich wieder das charakteristische, spektrale Muster eines 13-cis-isomerisierten Retinalchromophors. Die Ähnlichkeit zu Messungen an bR legt nahe, die positive Bande bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  der  $C_{14}$ - $C_{15}$ -Streckschwingungsmode des

---

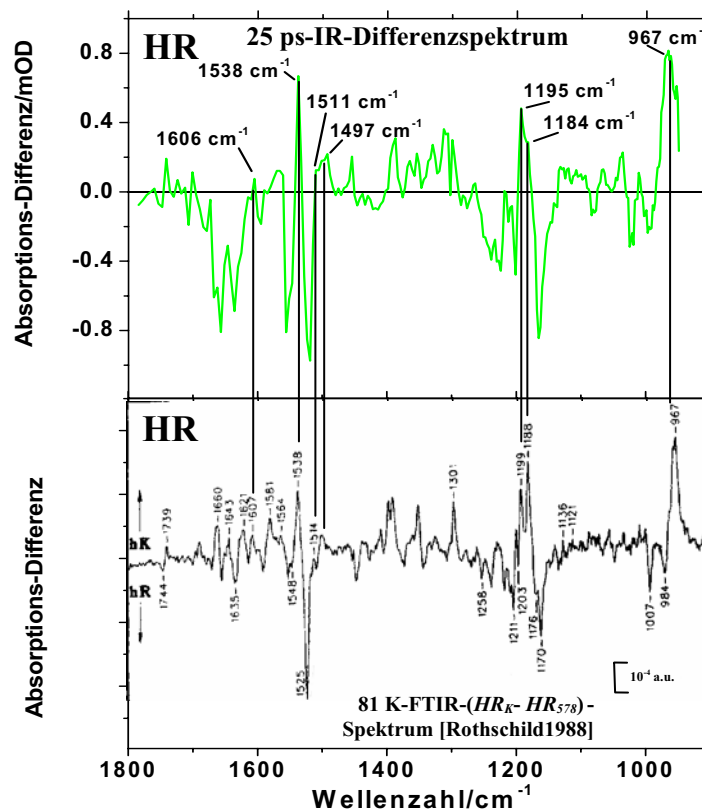
<sup>1</sup> Der FTIR liegt das Prinzip des Michelson-Interferometers zugrunde. Dabei wird der Spiegel eines Armes des Interferometers mit konstanter Geschwindigkeit bewegt. Damit wird die beobachtete Intensität der überlagerten Teilbündel zeitabhängig. Das Frequenzspektrum kann aus der Fouriertransformierten erhalten werden. Ein Vorteil der FTIR ist die gleichzeitige und damit viel schnellere Messung aller Wellenlängen zu jedem Zeitpunkt [Bell1972][Griffiths1986] [Koenig1981].

<sup>2</sup> Bei den Tieftemperatur-Messungen wird die Probe bei einer bestimmten Temperatur eingefroren. Nach Photoanregung hält der Photozyklus in dem Intermediat an, bei dem die thermische Energie kleiner als die Potentialschwelle zum nächsten Intermediat ist. Aufgrund der sehr niedrigen Temperatur muss ein Vergleich der Tieftemperatur-FTIR-Spektren mit unseren IR-Differenzspektren bei Raumtemperatur immer unter gewissen Einschränkungen betrachtet werden. Durch die tiefe Temperatur kann es z. B. zu Veränderungen im Protein kommen.

<sup>3</sup> Der Schulter bei  $1184(3)\text{ cm}^{-1}$  wird die  $C_8$ - $C_9$ -Streckschwingungsmode zugeordnet [Smith1986][Rothschild1988].

Retinalchromophors zuzuordnen. Im Ethylenbereich gibt es jeweils eine positive Schulter/Bande bei ca.  $1511\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1514\text{ cm}^{-1}$  (Rothschild et al.). Ein breites positives Signal liegt in unseren Messungen bei  $\sim 1497\text{ cm}^{-1}$  (Rothschild et al.:  $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ ). Die spektrale Position der Ethylenbande im  $HR_K$ -Zustand mit dem optischen Absorptionsmaximum von  $600\text{ nm}$  müsste bei ca.  $1522\text{ cm}^{-1}$  liegen [Aton1977]. Aufgrund der spektralen Nähe zu der Ethylenbleichbande des Grundzustandes bei  $1525\text{ cm}^{-1}$  verschiebt sich scheinbar die Position der Ethylen-K-Produktbande zu kleineren Wellenzahlen hin. Man kann der positiven Schulter im IR-Differenzspektrum bei  $1511\text{ cm}^{-1}$  noch die Ethylenbande im K-Zustand zuordnen [Rothschild1988]<sup>1</sup>.

Die positive Bande bei  $1538\text{ cm}^{-1}$  zeigt sich auch im FTIR-Spektrum. Sie wird einer Amid-II-Bande im  $HR_K$ -Zustand zugeordnet [Rothschild1988][Hackmann2001].



**Abbildung 4.7:** IR-Differenzspektrum ( $HR_K-HR_{578}$ ) nach 25 ps (oben) und statisches Tieftemperatur FTIR-Spektrum von  $HR_K-HR_{578}$  (unten) bei 81 K [Rothschild1988].

<sup>1</sup> Das 25 ps-IR-Differenzspektrum im Ethylenbereich wurde mit mehreren Lorentzkurven angefitet. Dabei wurden für die Produktbanden die Positionen  $1497(3)\text{ cm}^{-1}$  und  $1511(2)\text{ cm}^{-1}$  und  $1538(1)\text{ cm}^{-1}$  gefunden. Versucht man einen Fit mit einer Produktbande etwas näher an der theoretisch berechneten Position der K-Bande bei  $1522\text{ cm}^{-1}$ , so wird das Fitergebnis deutlich schlechter. Zur weiteren Untersuchung werden in Kapitel 4.1.2.4 die GF-Spektren im Ethylenbereich mit mehreren Lorentzkurven synthetisiert (Abb. 4.22).

### S<sub>1</sub>-Produktbanden

Dem elektronisch angeregten Zustand S<sub>1</sub> sind die positiven Banden im 150 fs-IR-Differenzspektrum (Abb. 4.4) zuzuordnen, also jene Banden, die instantan vorhanden sind<sup>1</sup>. Im 150 fs-Spektrum aus Abb. 4.4 entnimmt man positive Banden an vielen spektralen Positionen: Bei 1035 cm<sup>-1</sup>, 1065 cm<sup>-1</sup>, 1100 cm<sup>-1</sup> bis 1150 cm<sup>-1</sup>, 1250 cm<sup>-1</sup> bis 1300 cm<sup>-1</sup>, 1335 cm<sup>-1</sup>, 1350 cm<sup>-1</sup> bis 1436 cm<sup>-1</sup>, 1470 cm<sup>-1</sup>, 1561 cm<sup>-1</sup> und 1660 cm<sup>-1</sup>.

Die Dynamik des S<sub>1</sub> haben wir bereits in Kapitel 4.2.1.1 mit fs-Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich untersucht. Dabei zeigten sich für die Probewellenlänge 490 nm die beiden Zeitkonstanten 6.8(7) ps und 1.4 (2) ps für den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes (Abb. 4.2). Diese beiden Zeitkonstanten müssen sich auch in den fs-VIS-IR-Messungen zeigen. Der elektronisch angeregte Zustand S<sub>1</sub> absorbiert bei 516 nm (Schulter bei 460 nm) [Kandori1991]. Aus dem linearen Verhältnis der spektralen Position der Ethylenbande und dem optischen Absorptionsmaximum errechnet sich für die Position der Ethylenbande im S<sub>1</sub> 1557 cm<sup>-1</sup> für 460 nm und 1543 cm<sup>-1</sup> für 516 nm [Aton1977]. Die potentielle S<sub>1</sub>-Bande bei 1557 cm<sup>-1</sup> könnte der positiven Bande im 150 fs IR-Differenzspektrum um 1561 cm<sup>-1</sup> (Abb. 4.4) entsprechen und legt daher eine Zuordnung zu der Ethylenstreckschwingung im S<sub>1</sub> nahe. Die 1543 cm<sup>-1</sup> S<sub>1</sub>-Bande ist im 150 fs-Spektrum nicht aufgelöst. In Abb. 4.8/links ist die Dynamik der positiven Bande bei 1563 cm<sup>-1</sup> gezeigt. Die Bande zerfällt mit der Zeitkonstante 2.4(3) ps. Die langsame Komponente von ca. 7 ps taucht hier nicht auf. In Abb. 4.8/rechts ist die Transiente zu dem S<sub>1</sub>-Zerfall bei 1149 cm<sup>-1</sup>, also im Fingerprintbereich abgebildet. Das Signal zerfällt diesmal mit einer langen Zeitkomponente von 9(2) ps. Wir haben also zwei unterschiedliche Dynamiken für den

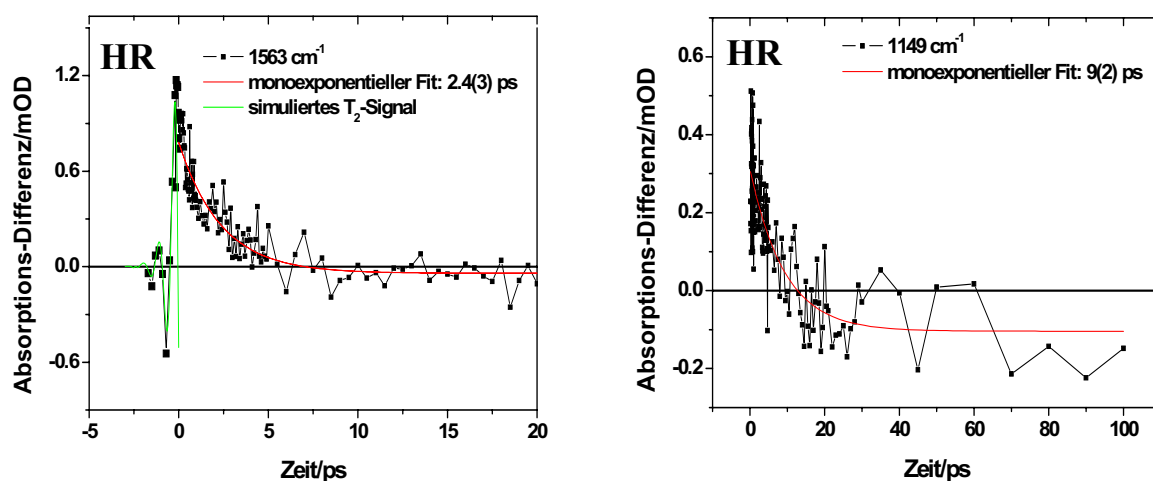


Abbildung 4.8: Dynamik im elektronisch angeregten Zustand S<sub>1</sub>: links bei 1563 cm<sup>-1</sup> und rechts bei 1149 cm<sup>-1</sup> (HR).

<sup>1</sup> Bei den S<sub>1</sub>-Banden handelt es sich um Chromophor- oder Proteinbanden.

Zerfall von  $S_1$ -Banden vorliegen, was für einen biphasischen Zerfall auf der  $S_1$ -Potentialoberfläche spricht, also einer Verzweigung der Reaktion in zwei Reaktionspfade.

In Abb. 4.8/links ist zu negativen Zeiten das  $T_2$ -Signal zu erkennen (siehe Kapitel 2.1.4). In Abb. 4.9 ist der entsprechende Zeitbereich nochmal vergrößert dargestellt.

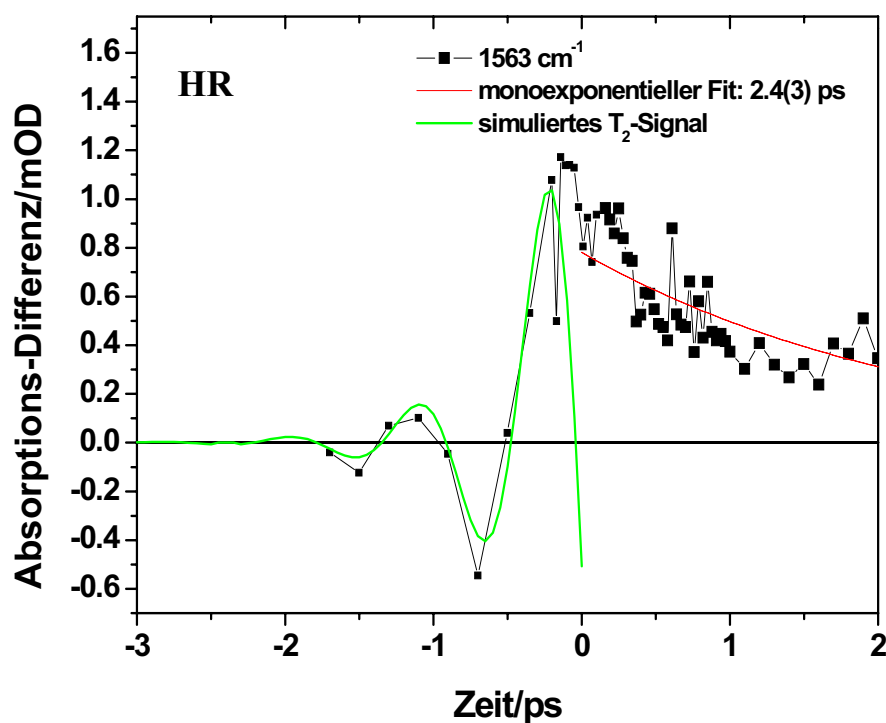


Abbildung 4.9: HR: Dynamik im elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  mit  $T_2$ -Verhalten zu negativen Zeiten. Ein simuliertes  $T_2$ -Signal ist mit eingetragen.

### Proteinbanden

Neben der Elektronendynamik im  $S_1$  beobachtet man auch die Proteindynamik: Bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  absorbieren die C-N-Streckschwingungen des Peptidgerüsts (Amid-II-Bereich). Die Dynamik dieser Streckschwingung für  $D_2O$ -substituiertes HR ist in Abb. 4.10 dargestellt. Das Zeitverhalten der Entstehung des Bleichsignals um  $1552\text{ cm}^{-1}$  unterscheidet sich von allen aufgenommenen Transienten an anderen spektralen Positionen. Das Bleichsignal entsteht nicht innerhalb der  $T_2$ -Zeit wie die Chromophorbanden, sondern stellt sich verzögert mit einer Zeitkonstante von  $2.6\text{ ps}$  ein und zerfällt dann langsam mit  $13.4\text{ ps}$ . Einen Ansatz zur Erklärung des verzögerten Bleichsignals ist die spektrale Nähe der negativen Amid-II-Bande zu den instantan entstehenden, positiven  $S_1$ -Banden, so dass sich im Überlappungsbereich positive und negative Signale teilweise gegenseitig aufheben. Somit

wäre die negative Bande erst sichtbar, wenn die positive Bande zerfallen ist, entstünde also

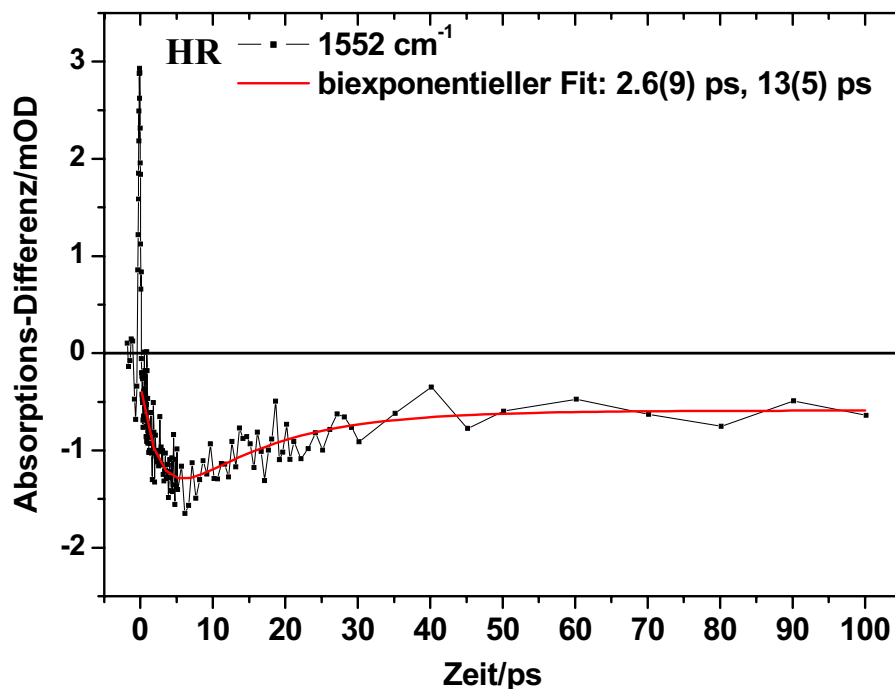


Abbildung 4.10: D<sub>2</sub>O-HR: Zeitverhalten bei 1552 cm<sup>-1</sup> (Amid-II-Bereich).

verzögert. Auch die Dissipation der vom Chromophor absorbierten Energie in Proteinmoden führt zu einem verzögerten Anstieg, da dieser Vorgang mehrere Pikosekunden dauert. Das bedeutet, dass die Proteinbanden aus dem Grundzustand  $HR_{578}$  nicht genauso schnell verschwinden wie die Chromophorbanden.

Der Grund für das verzögerte Bleichsignal kann auch in einer Veränderung der Ladungsverteilung in der Chromophorumgebung liegen: Durch die elektronische Anregung des Chromophors ändert sich dessen Dipolfeld sprunghaft, was sich auf die Schiffsbasis, auf Aminosäuren und auf Wassermoleküle auswirken kann. Der Zerfall des veränderten Dipolfeldes bewirkt dann die Verzögerung des Bleichsignals. Eine weitere Ursache wäre die Isomerisierung oder anfängliche Verdrillung des Retinalchromophors. Bei vergleichenden Messungen an Bakteriorhodopsin mit geblocktem Retinalchromophor zeigte sich allerdings, dass selbst ohne Isomerisierung bei 1552 cm<sup>-1</sup> der Verlauf des Signals prinzipiell gleich zu den Messungen an nativem bR ist [Herbst2002/I]. Daraus wurde geschlossen, dass die Proteinumgebung durch das veränderte Dipolfeld des Retinalchromophors und nicht durch dessen Isomerisierung beeinflusst wird. Es müssten Experimente an einer HR-Probe mit geblocktem Retinalchromophor durchgeführt werden, um dies auch hierfür zu zeigen.

In Tabelle 4.1 sind alle besprochenen Banden und deren Zuordnung zusammengefasst.

Wellenzahl/cm <sup>-1</sup>	Eduktbande	HR <sub>K</sub> - Produktbande
967		<b>C<sub>15</sub>-HOOP</b>
1167	<b>C<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>-Streck</b>	
1186	(?) <b>all-trans und (13-cis, 15-syn)</b>	
1184		<b>C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-Streck</b>
1195		<b>C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Streck</b>
1203	<b>C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Streck</b>	
1511		<b>C<sub>9</sub>-C<sub>14</sub>-Streck</b>
1524	<b>C<sub>9</sub>-C<sub>14</sub>-Streck</b>	
1538		<b>Amid-II: C-N-Streck</b>
1552	<b>Amid-II: C-N-Streck</b>	
1563		<b>?</b>
1636	<b>C<sub>15</sub>=NH<sup>+</sup></b>	
1660	<b>Amid-I: C-O-Streck</b>	

**Tabelle 4.1:** HR: Wichtige Produkt- und Eduktbanden und deren Zuordnung („Streck“ steht für Streckschwingung). Die Eduktbande bei 1186 cm<sup>-1</sup> stammt von der all-trans- und der (13-cis, 15-syn) - Grundzustandsspezies [Zimányi1997]. Eine Zuordnung zu einer bestimmten Schwingungs-mode konnte nicht gefunden werden.

#### 4.1.2.3 Analyse der Transienten mittels Global Fit (GF) und Singular Value Decomposition (SVD)

Zur Untersuchung der Dynamik der Photoreaktion in drei relevanten Spektral-Bereichen kommen zwei Analyseverfahren zum Einsatz: Singular Value Decomposition (SVD), auch Singulärwertzerlegung genannt und der globale, exponentielle Fit: Global Fit (GF). Mit beiden Methoden lassen sich überlagernde Prozesse, wie z. B. Produktentstehung, Edukt-Zurückbildung (recovery) und S<sub>1</sub>-Zerfall in der Zeit- und Frequenzdomäne voneinander trennen.

##### Globaler Fit (GF)

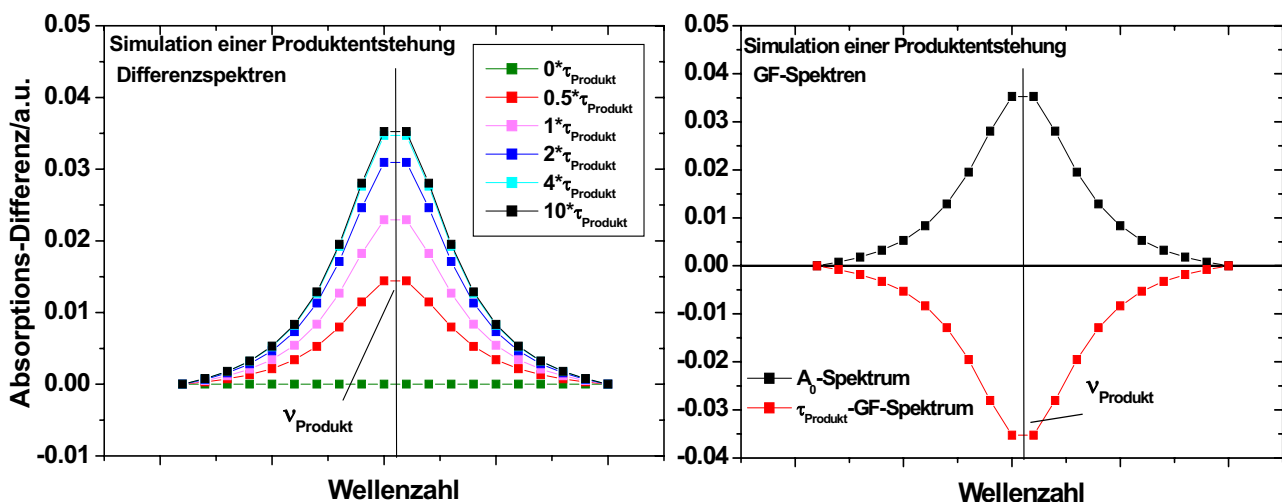
Der Global Fit (GF) ist eine Methode, bei der sich ein Satz von  $n_t$  Zeitpunkten bei  $n_\lambda$  Wellenlängen als eine Summe von Exponentialfunktionen darstellen lässt. Die Primärreaktion kann man sich als eine zeitliche Abfolge von Intermediaten vorstellen, die mit bestimmten Raten ineinander übergehen. Dieses Modell führt zu einem System von Differentialgleichungen erster Ordnung, das in diesem Fall durch eine multiexponentielle Fitfunktion gelöst wird. Die Absorptionsdifferenzen schreiben sich somit allgemein:

$$\Delta A(t_n, \lambda) = A_0(\lambda) + \sum_{i=1}^N A_i(\lambda) \cdot e^{-k_i \cdot t_n} \quad (4.1)$$

Der gesamte Datensatz lässt sich also mit  $N$  Raten  $k$  und den dazugehörigen  $N$  Amplituden-Spektren  $A_i(\lambda)$  beschreiben [Nagle1982][Knutson1983]. Dabei ist  $A_0(\lambda)$  die Amplitude der Transiente bei  $\lambda$  nach unendlich langer Zeit. Nimmt man alle  $n_\lambda$   $A_0(\lambda)$  zusammen, so erhält man das Differenzspektrum zu späten Zeiten,  $A_0$ -Spektrum genannt. Der GF fittet also Transienten über einen breiten spektralen Bereich mit einem gemeinsamen kleinen Satz von Ratenkonstanten an. Um die Darstellung (4.1) zu erhalten, muß iterativ folgender Ausdruck minimiert werden:

$$F = \sum_k^{n_\lambda} \sum_{j=1}^{n_t} \left[ \left( \sum_i^N A_i(\lambda_k) \cdot e^{-k_i \cdot t_j} + A_0(\lambda_k) \right) - A_{\text{exp}}(\lambda_k, t_j) \right]^2 \quad (4.2)$$

In  $F$  wird die quadratische Abweichung der Differenz zwischen dem multiexponentiellen Fit und den gemessenen Absorptionsdifferenzen errechnet. Es gibt  $N$  verschiedene Raten  $k$ .  $N$  entspricht auch der Mindestanzahl der Intermediate der Primärreaktion [Henry1992]. Die GF-Methode eignet sich gut zur Unterscheidung der sich spektral überlappenden Produkt- und Eduktbanden. Produktbanden sind in den Differenzspektren die positiven Banden (Zunahme der Absorption), im Fingerprintbereich bei ca.  $1195 \text{ cm}^{-1}$  zu späten Zeiten, Eduktbanden sind die negativen Banden (Abnahme der Absorption), im Fingerprintbereich bei ca.  $1203 \text{ cm}^{-1}$  und  $1167 \text{ cm}^{-1}$ . Negative Signale in den GF-Amplitudenspektren stehen für den Zerfall von Eduktbanden aber auch für die Entstehung von Produktbanden wie in Abb. 4.11 zu sehen ist. Positive Signale in den GF-Amplitudenspektren gehören z. B. zu instantan vorhandenen  $S_1$ -Banden des elektronisch angeregten Zustandes oder zu anderen Intermediat-Produktbanden <sup>1</sup>. Es soll nun beispielhaft die Entstehung einer Produktbande um  $\nu_{\text{produkt}}$  mit einer Rate von  $(\tau_{\text{Produkt}})^{-1}$  simuliert werden.  $\tau_{\text{Produkt}}$  ist die Zeitkonstante zur Entstehung des Produktes. Zum Zeitnullpunkt nach Photoanregung soll um  $\nu_{\text{produkt}}$  das Differenzsignal Null sein. Das Differenzspektrum zu späteren Zeiten hat um  $\nu_{\text{produkt}}$  die Form einer Lorenzkurve. In Abb. 4.1/links ist die zeitliche Entwicklung des Differenzspektrums um  $\nu_{\text{produkt}}$  gezeigt. Abb. 4.1/rechts stellt den globalen Fit der Differenzsignale um  $\nu_{\text{produkt}}$  dar. Das  $\tau_{\text{Produkt}}$ -GF-



**Abbildung 4.11:** Simulation einer Produktentstehung bei  $\nu_{\text{produkt}}$  mit  $\tau_{\text{produkt}}$ . Links: Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten nach Photoanregung in Einheiten von  $\tau_{\text{produkt}}$ . Rechts:  $\tau_{\text{produkt}}$ -GF-Spektrum mit  $A_0$ -Spektrum. Die Form der späteren Produktbande ist also schon im GF-Spektrum enthalten (vgl. Kapitel 4.1.2.5). Analog verhält es sich für den Zerfall von Bleichbanden.

<sup>1</sup> Positive Signale in den GF-Spektren stehen für den Zerfall von Produktbanden.



Spektrum (rotes Spektrum) hat die Form einer invertierten Absorptionsbande/Lorenzkurve bei  $\nu_{produkt}$ . Es ist bis auf den Vorfaktor mit dem  $A_0$ -Spektrum (angefitteter Wert der Transienten zu späten Zeiten) identisch. Bei der Rückbildung von Bleichbanden erhält man ein analoges Ergebnis für die GF-Spektren.

### **Singular Value Decomposition (SVD)**

Die SVD-Analyse hat einen grundlegend anderen Ansatz als der GF. Die Messdaten liegen wie beim GF als eine  $n_t \times n_\lambda$  - Matrix vor; sie besteht aus  $n_t$  Zeilen, den Zeitpunkten, und  $n_\lambda$  Spalten, den Wellenzahlen. In horizontaler Richtung bewegt man sich in der Matrix im Frequenzraum, in vertikaler Richtung im Zeitraum. Die SVD-Analyse sucht in dieser Matrix nach einem kleinen Satz aus Basisspektren, aus denen sich zu jedem Zeitpunkt das Differenzspektrum zusammensetzen lässt. Die Singulärwertzerlegung ist keine Fitroutine im eigentlichen Sinne, sondern findet zeitliche Korrelationen spektraler Komponenten und trennt somit die relevanten Signale vom Rauschen. Die SVD liefert aus einem Satz von Transienten die relevanten, charakteristischen Zeitverläufe und die dazugehörigen Amplituden-Spektren. Diese Zeitverläufe lassen sich mit einer oder mehreren Exponentialfunktionen anfitzen.

Die Ergebnisse können dann mit dem GF derselben Daten verglichen werden. Kommen vergleichbare Ergebnisse heraus, so ist der Ansatz des multiexponentiellen Fits aus dem GF gerechtfertigt. Differieren die Ergebnisse, kann der GF trotzdem gerechtfertigt sein.

Enthält das zu untersuchende System  $n_s$  spektral unterscheidbare Spezies, fordert das Lambert-Beersche-Gesetz, dass das zum Zeitpunkt  $t_j$  gemessene Spektrum als eine Linearkombination der Spektren dieser Spezies beschrieben werden kann:

$$A_{kj} = A(\lambda_k, t_j) = \sum_{n=1}^{n_s} f_n(\lambda_k) \cdot c_n(t_j) \quad (4.3)$$

Dabei sind  $A_{kj}$  die Absorptionsdifferenz zum Zeitpunkt  $t_j$  an der spektralen Position  $\lambda_k$ ,  $f_n(\lambda_k)$  ist die molare Absorption mit der Probendicke multipliziert der Spezies  $n$  bei  $\lambda_k$ , und  $c_n(t_j)$  ist die Konzentration der Spezies  $n$  zur Zeit  $t_j$  [Henry1992].  $A_{kj}$  lässt sich als Matrix  $A$  zusammenfassen.

Glg. (4.3) ist unabhängig von der Anzahl der Spezies im System oder der Größe der Datenmatrix. Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften der SVD ist, dass sie eine Bestimmung von  $n_s$  zulässt, unabhängig von irgendeiner kinetischen Analyse. In Abwesenheit von Messfehlern ist  $n_s$  der Rang der Matrix, also die Anzahl linear unabhängiger Zeilen bzw. Spaltenvektoren. Bei realen Messdaten liefert die SVD eine untere Schranke für die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Spezies. Die Anzahl der beteiligten Spezies ist mindestens die Anzahl der gefundenen Zeitkonstanten in den SVD-Transienten. Ein potentieller Nachteil der SVD ist, dass ein Teil der Daten verworfen wird und bei dem Fitprozess nicht berücksichtigt wird.

Jede reelle  $m \times n$  Matrix  $A$  ( $m \geq n$ ) kann so in drei Matrizen zerlegt werden, dass folgende Gleichung erfüllt ist (Singularwertzerlegung):

$$A = USV^T \quad (4.4)$$

$U$  und  $V$  sind  $m \times n$  Matrizen,  $S$  eine  $n \times n$  Diagonalmatrix. Dabei ist folgende Bedingung erfüllt:  $U$  und  $V^T$  sind orthogonal. Ist die Matrix  $A$  vom Rang  $r$ , so enthält die Diagonalmatrix  $S$  positive, der Größe nach geordnete Diagonalelemente  $s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_r$ , welche die Singularwerte der Matrix  $A$  sind. Die Datenmatrix  $A$  vom Rang  $r \leq n$  kann als Linearkombination von  $r$  Matrizen des Ranges 1 geschrieben werden. Die Spalten von  $U$  und  $V$  sind die rechten und linken singulären Vektoren von  $A$ . Die Diagonalelemente von  $S$  enthalten die Signifikanz für die ebenfalls nach Signifikanz geordneten Transienten in  $U$  und die dazugehörigen Spektren in  $V$ . Um die experimentellen Daten zu beschreiben, benötigt man nur sehr wenige Transienten und Spektren, zu denen die höchsten Signifikanzwerte gehören. Die zu den SVD-Spektren mit kleiner Signifikanz zugehörigen SVD-Transienten weisen nur Rauschen auf. Die SVD-Analyse gibt daher Hinweise, mit wieviel Zeitkonstanten man den GF versuchen sollte. Man muss im Vergleich zum GF bei der SVD nur noch einige Transienten anfitten.

### **Besonderheiten der SVD**

Bei der SVD kann folgender Fall auftreten: Liegen in dem zu untersuchenden System zwei Spezies vor, deren Spektrum (oder die Beträge der Spektren) einen sehr ähnlichen Verlauf haben, so kann die SVD nicht zwischen diesen beiden Spezies unterscheiden und gibt nur ein

SVD-Spektrum, in der die Spektren für beide Spezies subsummiert sind, aus. In der zu diesem Spektrum dazugehörigen Transiente finden sich die zwei Zeitkonstanten für die beiden Spezies. Diesen Fall bezeichne ich als „SVD-Subsummierung“.

Bei der Analyse eines Datensatzes mit der SVD-Analyse kann es vorkommen, dass z. B. die Transiente des relevantesten SVD-Spektrums durch zwei Zeitkonstanten bestimmt ist und die Transiente des zweit-relevantesten SVD-Spektrums durch eine Zeitkonstante, die auch in der zuerst genannten Transiente vorkommt. Diesen Fall bezeichne ich als „Korrelation von SVD-Spektren“. Durch eine Rotation der  $V$ -Matrix und der  $U$ -Matrix lässt sich die Beimischung des einen SVD-Spektrums in das andere verkleinern. Führen wir eine orthogonale Drehmatrix  $R$  ein ( $I$  ist Einheitsmatrix), es gilt also:

$$RR^T = I \quad (4.5)$$

Erweitern wir den Ausdruck in Glg. (4.4) mit der Einheitsmatrix aus Glg. (4.5):

$$\begin{aligned} A &= USV^T = USIV^T = US(RR^T)V^T = \\ &(USR)(R^T V^T) = (USR)(VR)^T \equiv U^R (V^R)^T \end{aligned} \quad (4.6)$$

Die somit neu gewonnenen Matrizen  $U^R=USR$  und  $V^R=VR$  enthalten neue Basisvektoren bzw. Amplituden, so dass sich die Ausgangsmatrix  $A$  auch mit diesen Matrizen darstellen lässt. Wichtig ist hierbei, dass zwar für  $V^R$  immer noch die Orthogonalitätsbedingung gegeben ist, jedoch für  $U^R$  nicht mehr [Henry1992]. Für das obige Beispiel einer Beimischung des zweit-relevantesten SVD-Spektrums in das relevanteste nimmt man die in der Glg. (4.7) definierte Drehmatrix.

$$R = \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (4.7)$$

Um die Rotation praktisch durchzuführen, bildet man aus den ersten drei Spalten der  $U$ -Matrix, aus den ersten drei Zeilen und Spalten der  $S$ -Matrix und aus den ersten drei Spalten der  $V$ -Matrix jeweils eine neue Matrix. Durch die in Glg. (4.6) beschriebene Prozedur mit der in Glg. (4.7) definierten Drehmatrix wird die Korrelation in den ersten beiden Spalten der ursprünglichen  $V$ -Matrix aufgehoben, so dass nach der Rotationsprozedur die zu den neuen Basisspektren von  $V^R$  zugehörigen Transienten in  $U^R$  mit nur jeweils einer Zeitkonstante beschrieben werden können.

#### 4.1.2.4 Dynamik im spektralen Bereich der C-C-Streckschwingungen, C=C-Streckschwingung und C=ND-Streckschwingung

In diesem Kapitel wird die Dynamik der Photoreaktion in drei relevanten Spektralbereichen untersucht. Dabei werden die Analyseverfahren Singular Value Decomposition (SVD) und der globale, (multi)exponentielle Fit (GF) verwendet. Somit können sich überlagernde Prozesse, wie z. B. Produktentstehung, Edukt-Zurückbildung (recovery) und  $S_1$ -Zerfall im Zeit- und Frequenzraum unterschieden werden. Ein wesentlicher Vorteil der Infrarot-Schwingungsspektroskopie gegenüber der optischen Spektroskopie sind die spektral schmalen Infrarotbanden. Bei hinreichend guter spektraler Auflösung lässt sich zwischen Produkt- und Eduktbanden gut differenzieren.

Eine zentrale Frage ist die Zuordnung der Zeitkonstanten für den reaktiven Pfad zum Photoprodukt  $HR_K$ , bzw. wie schnell die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors geschieht.

##### Spektralbereich der C-C-Streckschwingungen („Fingerprintbereich“)

Kommen wir nun zu den Messungen im Fingerprintbereich des Halorhodopsins, also dem Spektralbereich der C-C-Streckschwingungen zwischen  $1140\text{ cm}^{-1}$  und  $1230\text{ cm}^{-1}$ . In diesem Bereich befinden sich Markerbanden, die charakteristisch für die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors, also der Produktentstehung sind. Wie in Kapitel 4.1.2.2 beschrieben, absorbieren im Fingerprintbereich die  $C_{10}-C_{11}$  und  $C_{14}-C_{15}$ -Streckschwingungen des Retinals in all-trans-Konfiguration bei  $1167\text{ cm}^{-1}$  und  $1203\text{ cm}^{-1}$  im Grundzustand des HR. Durch die 13-cis-Konfiguration des Retinalchromophors des  $HR_K$  verschiebt die  $C_{14}-C_{15}$ -Bande nach ca.  $1195\text{ cm}^{-1}$ . Die Resultate im Fingerprintbereich lassen auf die strukturelle Dynamik der Isomerisierung auf molekularer Ebene schließen.

In Abb. 4.12 sind die IR-Differenzspektren zu mehreren Zeitpunkten im Fingerprintbereich dargestellt. Die spektrale Auflösung lag bei ca.  $3\text{ cm}^{-1}$ , die Systemantwort bei ca. 250 fs. Man sieht die beiden Bleichbanden zu den  $C_{10}-C_{11}$ - und  $C_{14}-C_{15}$ -Streckschwingungen bei  $1167\text{ cm}^{-1}$  respektive  $1203\text{ cm}^{-1}$  und die  $C_{14}-C_{15}$ -Produktbande bei  $1195\text{ cm}^{-1}$ . Zusammengenommen zeigen die Banden schon bei 2.5 ps das charakteristische Muster einer 13-cis-Konfiguration des Retinalchromophors.

Der globale Fit ist das optimierte Fitergebnis über einen breiten Wellenlängenbereich bei festgehaltenen Zeitkonstanten. Dabei geht teilweise die spezielle Dynamik bei bestimmten Wellenzahlen verloren. Vor den eigentlichen SVD- und GF-Analysen im Fingerprintbereich sollen daher im Bereich einer Bleichbande und der Produktbande monoexponentielle Einzelfits vorgenommen werden. Die Transienten werden immer erst ab 150 fs betrachtet.

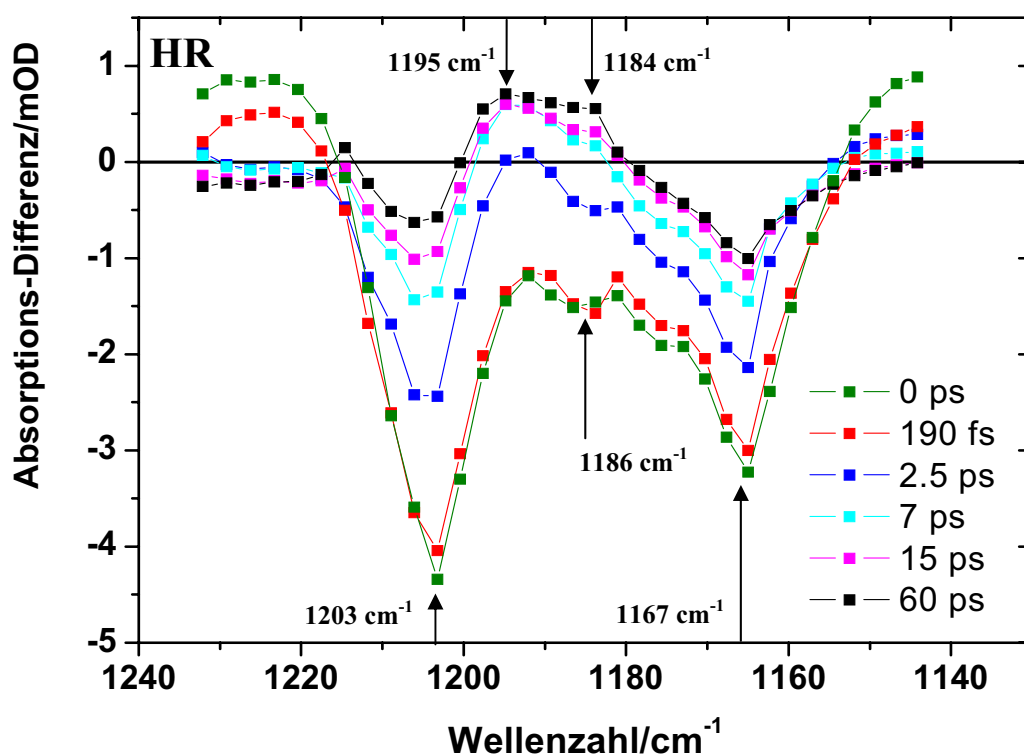


Abbildung 4.12: Transiente Spektren im Fingerprintbereich zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Photoanregung (HR).

In Abb. 4.13 ist die Transiente des Rückgangs der Bleichbande bei  $1203\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Es zeigt sich ein Rückgang des Bleichsignals mit  $3.5(1)\text{ ps}$ . Die Systematik im Verlauf des Residuums deutet an, dass mehr als eine Zeitkonstante zur Beschreibung des Rückgangs des Ausgangszustandes nötig ist. Abb. 4.14 zeigt die Transiente bei  $1195\text{ cm}^{-1}$ . Die Produktentstehung geschieht mit  $2.0(1)\text{ ps}$ <sup>1</sup>. Die Produktentstehung läuft demnach schneller als der Rückgang des Bleichsignals ab. Das Residuum beim Fit der Transiente im Produktbereich weist kaum eine Systematik auf. Das Zeitverhalten der

<sup>1</sup> Bei  $1184\text{ cm}^{-1}$  entsteht eine Produktbande. Hier zerfällt jedoch auch die Eduktbande bei  $1186\text{ cm}^{-1}$ .

Transiente im Produktbereich wird daher mit nur einer Zeitkonstante hinreichend genau beschrieben.

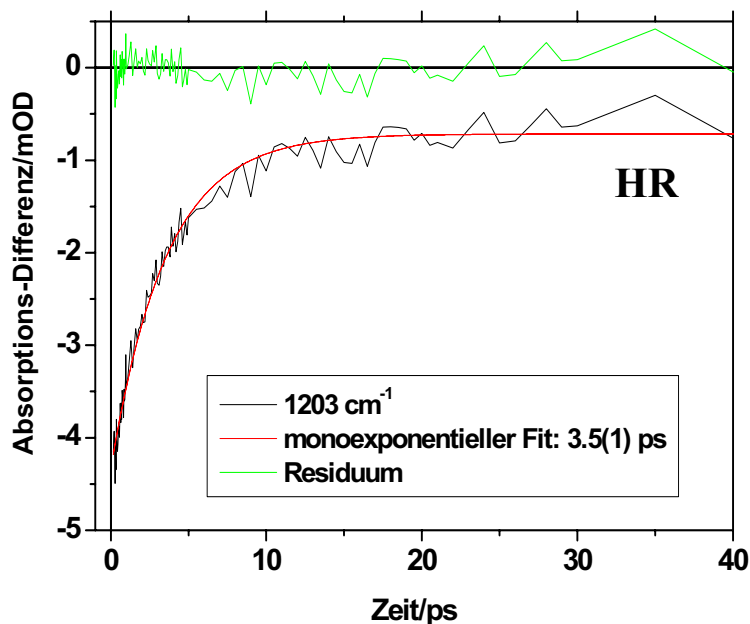


Abbildung 4.13: Beobachtung der Wiederkehr des Ausgangszustandes  $HR_{578}$  am Rückgang des Bleichsignals: Transiente bei  $1203\text{ cm}^{-1}$  mit monoexponentiellem Fit und Residuum (HR).

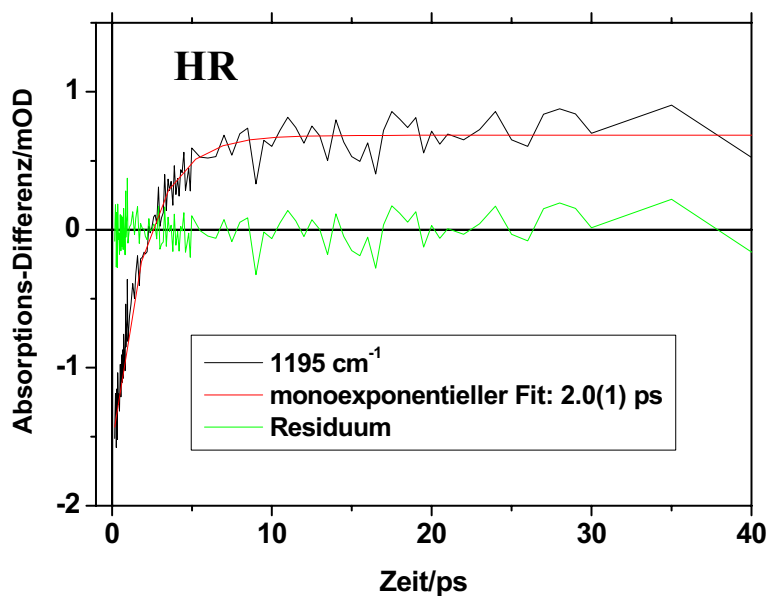


Abbildung 4.14: 13-cis-Produktentstehung: Transiente bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  mit monoexponentiellem Fit und Residuum (HR).

**GF und SVD-Analyse im „Fingerprintbereich“ (C-C-Streckschwingung)**

Zur Trennung der Dynamik der Produkt- und Eduktbanden wird nun eine SVD- und GF-Analyse des Fingerprintbereiches durchgeführt. Abb. 4.15 gibt die Ergebnisse der Analysemethoden wider. Zusammengenommen weisen die SVD-Transienten zwei unterschiedliche Zeitkonstanten: 6.5(4) ps und 2.8(1) ps auf. Ich gehe daher von wenigstens zwei an der Photoreaktion beteiligten Intermediaten aus. Der multiexponentielle, globale Fit wird somit mit zwei Zeitkonstanten durchgeführt. Der GF ergibt eine Dynamik, die durch die beiden Zeitkonstanten 6.9(5) ps und 1.8(1) ps bestimmt ist. Das  $A_0$ -Spektrum ist die angefittete Amplitude der Transienten zu späten Zeiten und ist dem 60 ps-Differenzspektrum aus Abb. 4.12 sehr ähnlich. Trotz einiger Unterschiede zwischen den SVD- und GF-Spektren gibt es auch viele Gemeinsamkeiten: Im Bereich der Eduktbanden bei  $1204\text{ cm}^{-1}$  und  $1167\text{ cm}^{-1}$  zeigen beide Analysemethoden Minima, die in ihrer Form Absorptionsbanden ähneln. Die Dynamik ist dort somit durch eine längere Zeitkonstante charakterisiert. Im Produktbereich bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  zeigen SVD und GF die Dominanz der kurzen Zeitkomponente.

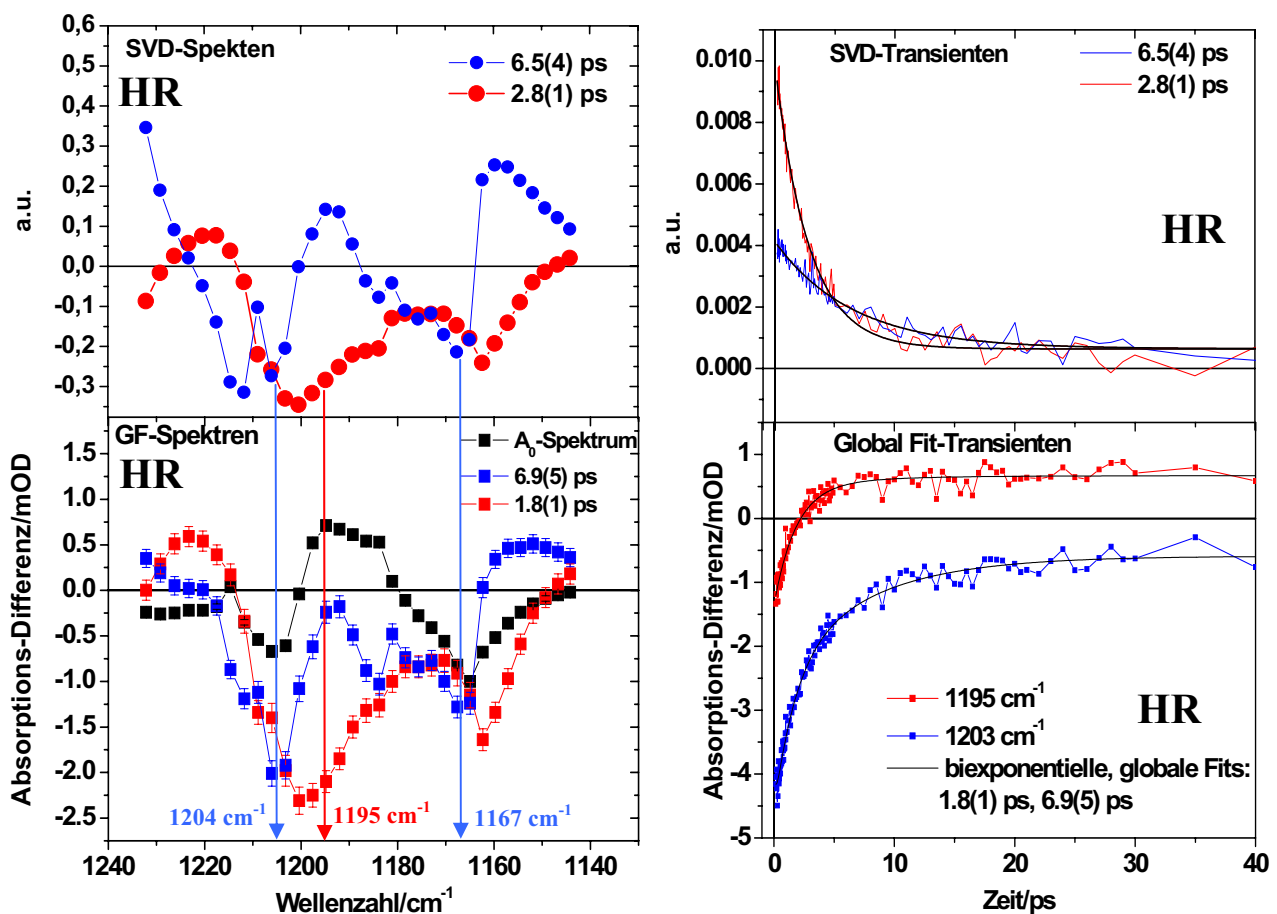


Abbildung 4.15: HR: SVD (oben/links und rechts) und GF (unten/links und rechts) im Fingerprintbereich.



### Diskussion der GF-Spektren

Das 1.8 ps-GF-Amplitudenspektrum hat im Produktbereich die Form einer Absorptionsbande mit dem Schwerpunkt bei  $1198\text{ cm}^{-1}$ . Der Schwerpunkt liegt etwas höherenergetischer als die Produktbande bei  $1195\text{ cm}^{-1}$ : Der Rückgang des Bleichsignals bei  $1203\text{ cm}^{-1}$  könnte daher noch schnelle Anteile haben. Das 6.9 ps-GF-Spektrum ist an der Position des Produktes bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  fast Null. Der Produktbereich wird also von der 1.8 ps-Komponente dominiert. Die Produktentstehung zum  $HR_K$  und die damit verbundene all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors geschehen eindeutig schnell mit nur einer Zeitkonstante von 1.8 ps<sup>1</sup>! Bei  $1162\text{ cm}^{-1}$  hat das GF-Amplitudenspektrum der schnellen Komponente ein Minimum. Die Position liegt etwas niederenergetischer als die Position der Bleichbande bei  $1167\text{ cm}^{-1}$  (siehe aber auch Abb. 4.34).

Das 6.9 ps-GF-Spektrum hat die Form des 190 fs-Differenzspektrums aus Abb. 4.12, woraus deutlich wird, dass mit dem 6.9 ps-GF-Spektrum der Rückgang der nicht isomerisierten Moleküle in den Ausgangszustand  $HR_{578}$  wiedergegeben wird. Die Wiederkehr des Ausgangszustandes wird also durch die langsame Zeitkomponente charakterisiert. Es gibt jedoch auch Anteile der schnellen Komponente in dem Rückgang der Bleichsignale (Abb. 4.34).

An dieser Stelle soll auf Besonderheiten in den GF-Spektren eingegangen werden. Bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  liegt im 6.9 ps-GF-Spektrum ein Minimum in Form einer Absorptionsbande vor. Auch diese Bleichbande des Grundzustandes zerfällt somit mit 6.9 ps und 1.8 ps. In [Zimányi1997] wird für die Herkunft dieser Bande Anteile an Spezies mit all-trans- und mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration ( $HR_{558}$ ) des Retinals aus dem Grundzustand angenommen. In Kapitel 4.1.3 wird der Einfluss der dunkel adaptierten Spezies aus dem Grundzustand untersucht.

Banden von  $S_1$ -Spezies zeigen sich in den IR-Differenzspektren an den positiven und instantan vorhanden Signalen. Bei  $1220\text{ cm}^{-1}$  zerfällt der  $S_1$ -Zustand vor allem mit der schnellen Zeit von 1.8 ps, wohingegen bei  $1150\text{ cm}^{-1}$  der Zerfall des  $S_1$  langsam mit hauptsächlich 6.9 ps geschieht. Dass der  $S_1$  mit zwei verschiedenen Zeitkonstanten zerfällt, ist ein deutlicher Hinweis auf eine Aufspaltung der Reaktion im  $S_1$ -Zustand in zwei Reaktionskanäle. Im  $S_1$  müssen zwei relaxierte Spezies vorliegen, wovon eine mit 1.8 ps zum

---

<sup>1</sup> Die Entstehung der Produktbande bei  $1184\text{ cm}^{-1}$  ist direkt mit dem Zerfall der Eduktbande bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  überlagert (siehe Kapitel 4.1.2.5 (Abb. 4.34 und Diskussion)).

Photoprodukt  $HR_K = HR_{600}$  (befindet sich auf der Potentialoberfläche des elektronischen Grundzustandes) mit 13-cis-isomerisiertem Retinalchromophor übergeht. Die andere  $S_1$ -Spezies zerfällt direkt mit 6.9 ps zum Ausgangszustand  $HR_{578}$ .

### Monoexponentielle Einzelfits der Transienten im Fingerprintbereich

Die Ergebnisse im Fingerprintbereich sollen noch einmal in einer übersichtlichen Darstellung in Abb. 4.16 gezeigt werden. Für die Transienten wurden monoexponentielle Einzelfits durchgeführt, um einen allgemeinen Trend für die mittlere Größe der Zeitkonstante zu finden. Aus Abb. 4.16 geht hervor, dass im Produktbereich ein lokales Minimum der Zeitkonstante liegt. Zu den Bleichbanden hin wird die Zeitkonstante wieder länger, wobei unterhalb von  $1160\text{ cm}^{-1}$  die Zeitkonstante wieder deutlich kleiner wird. Der Grund dafür liegt an der Überlagerung des langsamen  $S_1$ -Zerfalls bei  $1150\text{ cm}^{-1}$  mit dem (langsamen und schnellen) Rückgang der Bleichbande bei  $1165\text{ cm}^{-1}$ . Dadurch wird die langsame Komponente aus dem Rückgang des Bleichsignales kompensiert, und die mittlere Zeitkomponente wird klein. Um  $1220\text{ cm}^{-1}$  wird die Zeitkonstante deutlich kleiner. Hier liegen  $S_1$ -Banden, die schnell zerfallen. Um den Überlagerungseffekt vom Rückgang des Bleichsignales und Zerfall von  $S_1$ -Bleichbanden zu verdeutlichen,

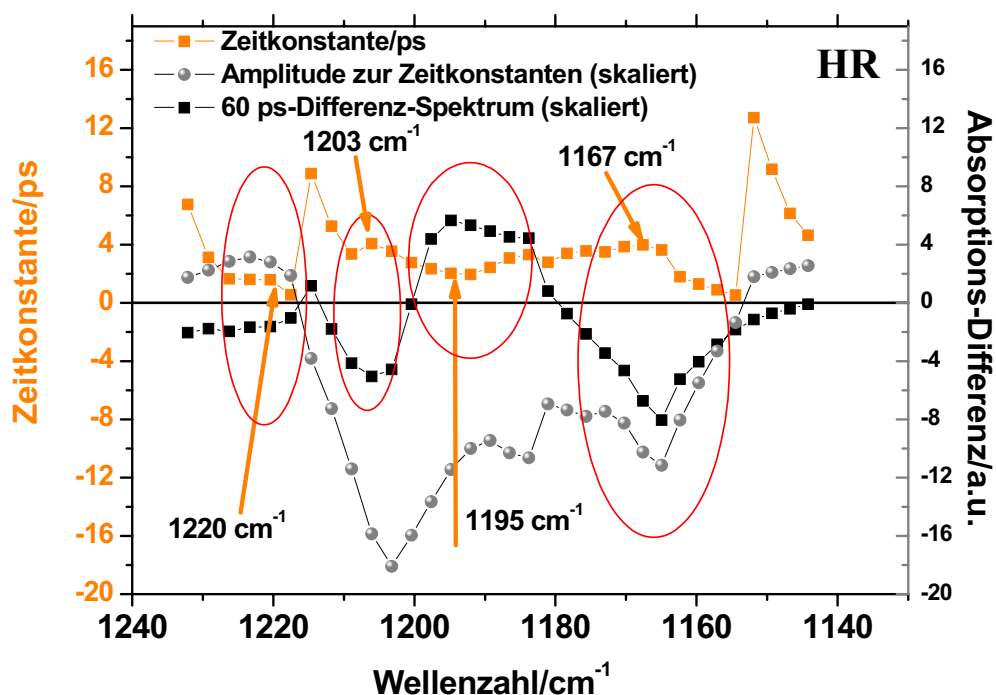


Abbildung 4.16: HR: Zeitkonstanten im Fingerprintbereich aus monoexponentiellen Einzelfits der Transienten.

zeigt Abb. 4.17 die Transiente bei  $1157\text{ cm}^{-1}$ , die einen sehr speziellen Verlauf aufweist, der sich aus der Überlagerung erklären lässt. Mit der Zeit wird der Betrag der Absorptionsdifferenz mit einer kurzen Zeitkonstante von ca. 2 ps erst kleiner. Danach wird der Betrag der Absorptionsdifferenz mit einer größeren Zeitkonstante von ungefähr 5.4 ps wieder größer.

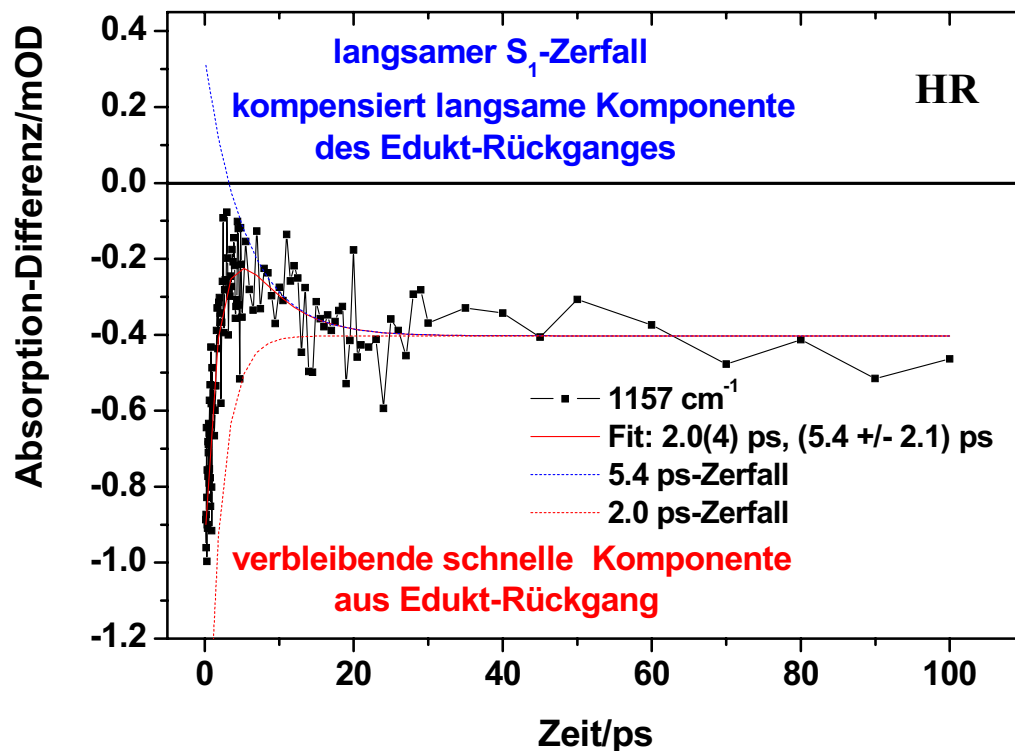
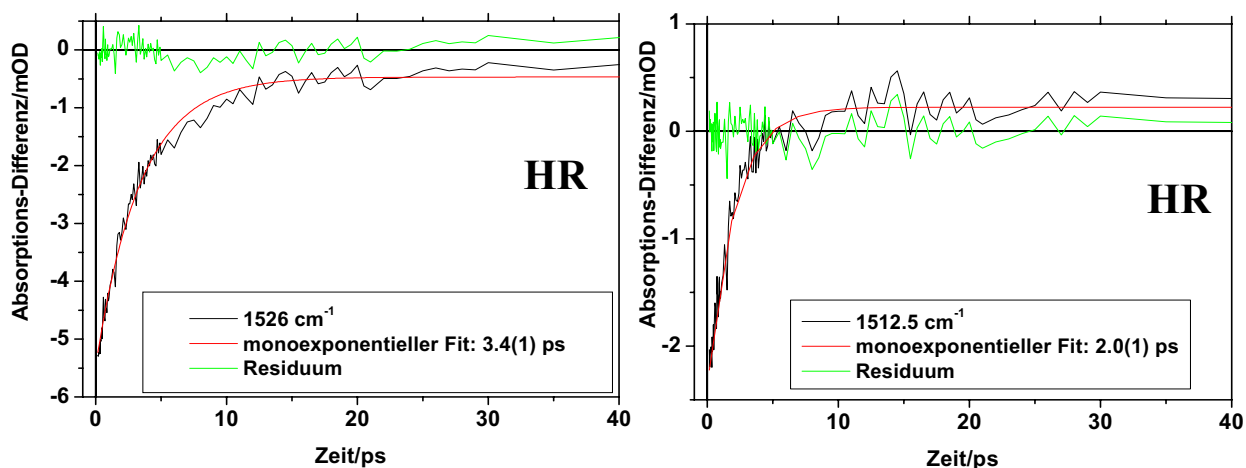


Abbildung 4.17: Besondere Dynamik bei  $1157\text{ cm}^{-1}$  aus Überlagerung  $S_1$ -Zerfall und Bleichbandenrückgang.

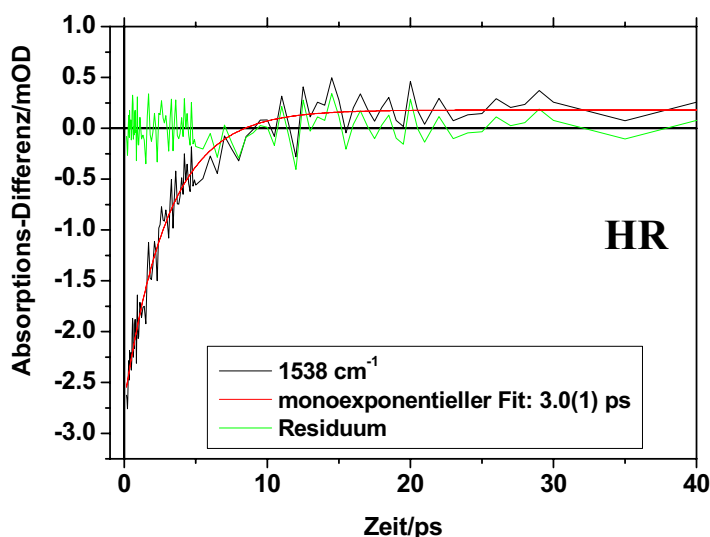
### Spektralbereich der C=C-Streckschwingung („Ethylenbereich“)

Kommen wir nun zu der Auswertung der Messungen im Spektralbereich der in-Phase schwingenden C=C-Streckschwingungen des Retinalchromophors, dem „Ethylenbereich“. Im Ethylenbereich lässt sich zusätzlich die Dynamik einer Proteinreaktion beobachten. Auch die ultraschnelle Dynamik des  $S_1$  zeigt sich hier. Sogar die Dynamik einer dunkel-adaptierten Spezies aus dem Grundzustand  $HR_{558}$  wird erwartet. In Abb. 4.18 sind explizit die Dynamiken bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  (links) und bei  $1512.5\text{ cm}^{-1}$  (rechts) dargestellt. Im Eduktbereich bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  geht der Rückgang des Bleichsignals mit  $3.4(1)\text{ ps}$  vonstatten. Im Bereich einer möglichen Ethylen-Produktbande um  $1512.5\text{ cm}^{-1}$  steigt das Signal mit  $2.0(1)\text{ ps}$  an. Im Eduktbereich geht die Bleichbande somit langsamer zurück. Ein Blick auf die Residuen der

Transiente bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  verrät, dass die Dynamik der Wiederkehr des Ausgangszustandes  $HR_{578}$  durch mehrere Zeitkonstanten charakterisiert sein wird. Abb. 4.19 zeigt die Dynamik im Bereich des Produktes bei  $1538\text{ cm}^{-1}$ . Das Produkt entsteht hier mit  $3.0(1)\text{ ps}$ , also wieder etwas schneller als der Rückgang des Bleichsignals bei  $1526\text{ cm}^{-1}$ .



**Abbildung 4.18:** HR: Dynamik im Ethylenbereich. Links: Bereich der Bleichbande um  $1526\text{ cm}^{-1}$ , rechts: Bereich des Photoproduktes bei  $1512.5\text{ cm}^{-1}$  (HR).



**Abbildung 4.19:** HR: Dynamik im Ethylenbereich bei der Produktbande um  $1538\text{ cm}^{-1}$

Abb. 4.20 zeigt die transienten Spektren zu mehreren Zeitpunkten. Aus diesen Spektren lässt sich schon einiges ablesen: Im 190 fs-Spektrum liegt um  $\sim 1538 \text{ cm}^{-1}$  eine Schulter in der Bleichbande, der man eine Ethylenschwingung des Retinalchromophors in der (13-cis, 15-syn)- Konfiguration der dunkel adaptierten Spezies  $HR_{558}$  zuordnen könnte [Gerscher1997] (Kapitel 4.1.3). An den Rändern des Spektrums im Ethylenbereich ist eine

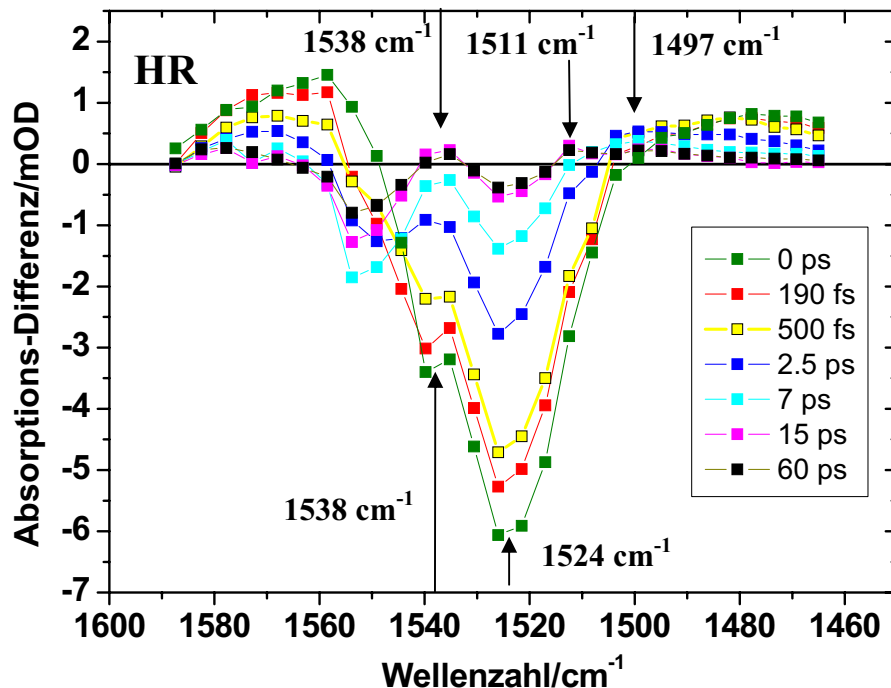


Abbildung 4.20: HR: Transiente Spektren im Ethylenbereich zu verschiedenen Zeitpunkten.

ausgeprägte  $S_1$ -Dynamik zu erkennen, wobei die Dynamik hier schnell abläuft.

### GF und SVD-Analyse im „Ethylenbereich“ (C=C-Streckschwingung)

Eine Trennung der Dynamik von Produkt- und Eduktbanden wird im Ethylenbereich schwierig werden, da Edukt- und Produktbanden hier sehr nah beieinander liegen. Durch diese Nähe kann es auch zu Verschiebungen der beobachteten Positionen der Produktbanden kommen. Abb. 4.21 enthält das Ergebnis des GF und der SVD-Analyse. Sie zeigt die zwei signifikantesten SVD-Spektren. Das relevanteste Spektrum gehört zu der SVD-Transienten, die mit einer Zeitkonstante von 8.7(9) ps zerfällt, das zweit-relevanteste Spektrum zu der SVD-Transiente mit der Zeitkonstante 2.6(2) ps. Insgesamt liegen also zwei verschiedene

4 Ergebnisse und Diskussion/./4.1.2.4 Dynamik im spektralen Bereich der C-C-Streck-  
schwingungen, C=C-Streckschwingung und C=ND-Streckschwingung

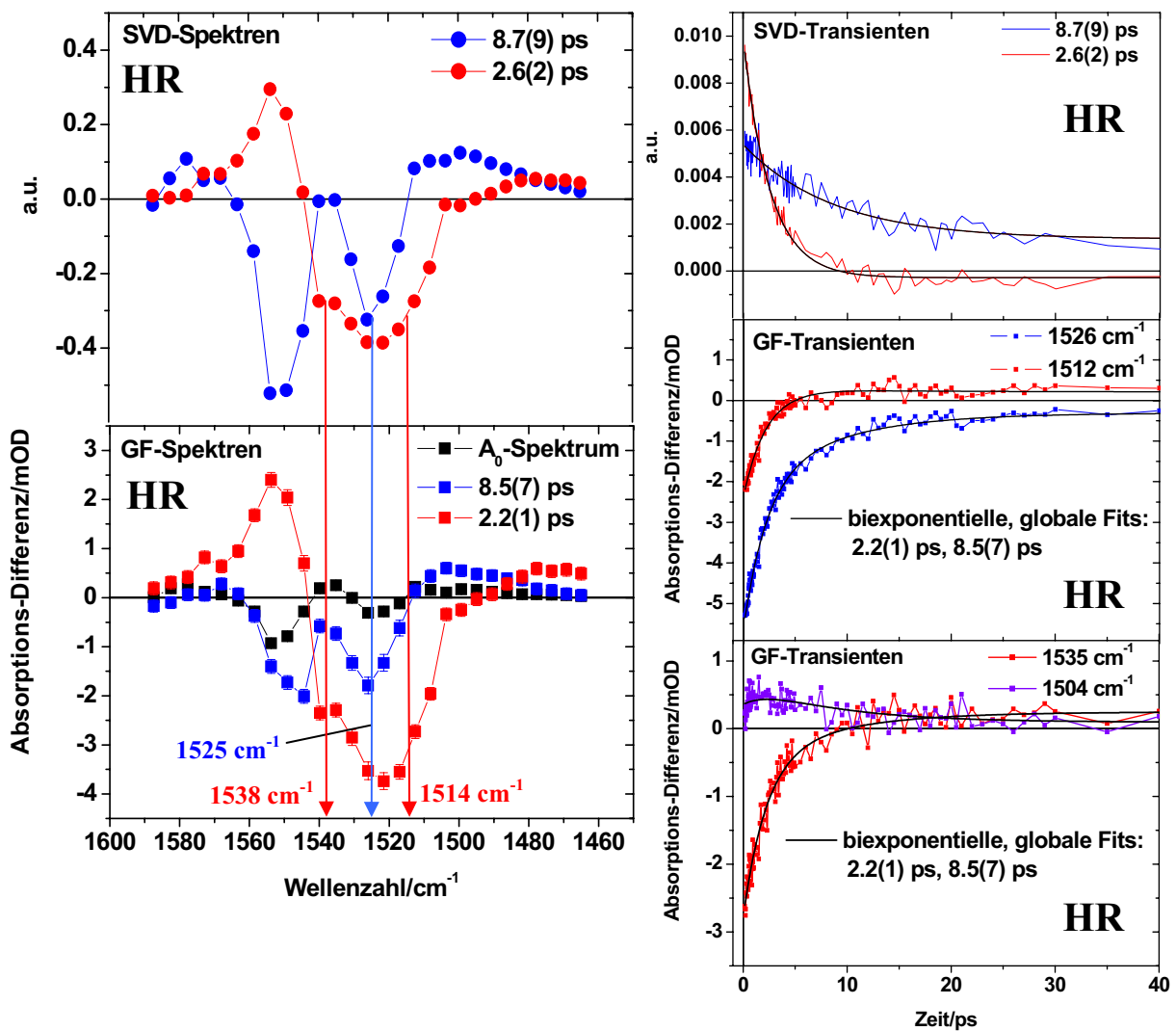


Abbildung 4.21: HR: SVD (oben/links und rechts) und GF (unten/links und rechts) im Ethylenbereich.

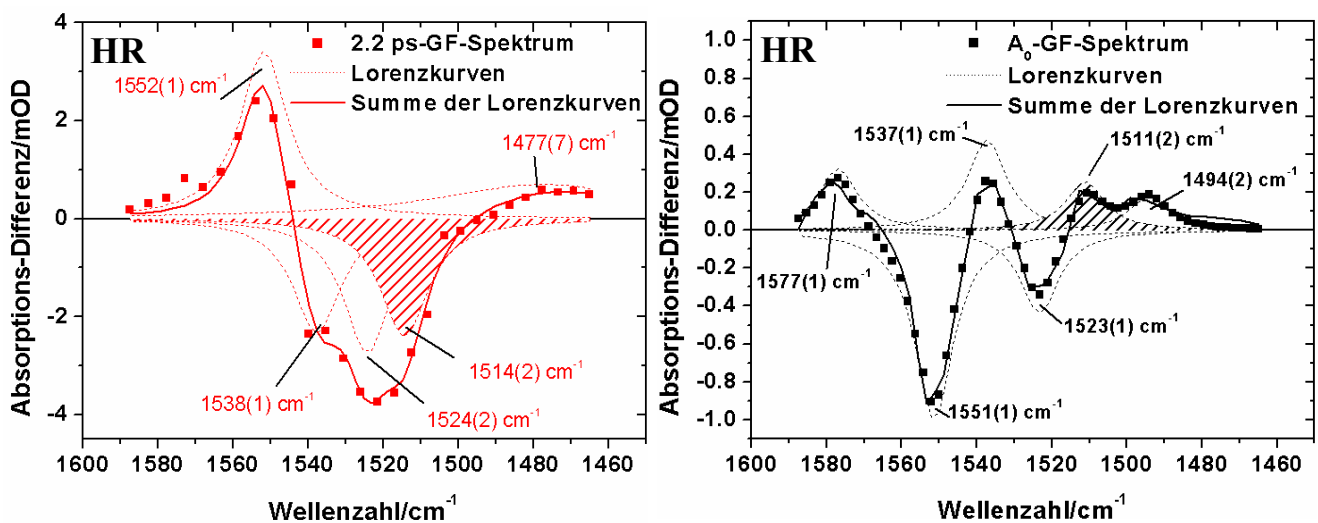


Abbildung 4.22: HR: Links: Mit Lorentzkurven angefitztes 2.2 ps-GF-Spektrum. Rechts: Mit Lorentzkurven angefitztes  $A_0$ -Spektrum (entspricht IR-Differenzspektrum zu späten Zeiten).

Zeitkonstanten vor: Eine kurze von 2.6 ps und eine lange von 8.7 ps. Aufgrund der Fülle verschiedener Vorgänge im Ethylenbereich bedarf es hier einer besonderen Analyse und Interpretation der Ergebnisse. Es lassen sich viele Vergleiche zwischen den SVD-Spektren und den GF-Amplitudenspektren machen. Bei dem GF und der SVD gingen alle Daten ab 150 fs in die Statistik mit ein. Die Daten zwischen 0 ps und 150 fs wurden nicht berücksichtigt, da in diesem Bereich der Pump- und der Probepuls noch wechselwirken und somit z. B.  $T_2$ -Effekte eine Rolle spielen. Die Daten wurden nicht entfaltet. Die SVD- und die GF-Spektren im Ethylenbereich sind sich in ihren Verläufen ähnlich. SVD und GF bestätigen sich daher gegenseitig ihre Ergebnisse. Der Ansatz des multiexponentiellen GF ist daher gerechtfertigt. Im „Anhang/Ergänzungen zur Auswertung“ wird ein GF im Ethylenbereich mit drei Zeitkonstanten versucht.

### **Diskussion der GF-Spektren**

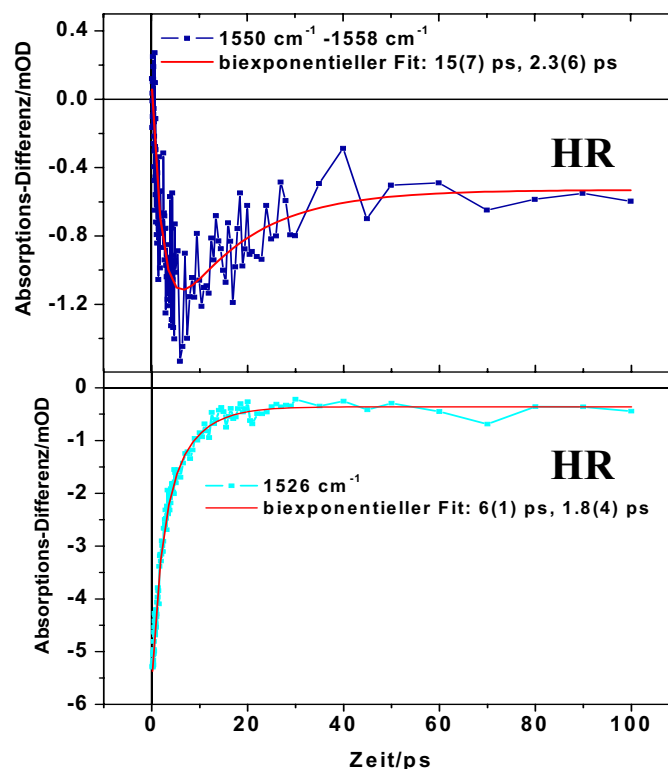
Dem 8.5 ps- und dem 2.2 ps-GF-Spektrum folgend, geschieht der Rückgang des Bleichsignals bei  $1525\text{ cm}^{-1}$  mit der langsamen aber auch mit der schnellen Zeitkomponente. In der Literatur wird das optische Absorptionsmaximum für den  $HR_K$  – Produktzustand mit 600 nm [Arlt1995] angegeben. Das entspräche einer Position für die C=C-Streckschwingung im  $HR_K$  bei ca.  $1522\text{ cm}^{-1}$  [Aton1977]. Um die Positionen für Produkt- und Eduktbanden bzw. für deren Entstehung oder Zerfall zu bestimmen, wurden das 2.2 ps-GF-Spektrum und das  $A_0$ -GF-Spektrum mit Lorenzkurven angefitet. Das Ergebnis ist in Abb. 4.22 zu sehen. Im  $A_0$ -GF-Spektrum (Abb. 4.22/rechts) zeigt die Synthese zwei Produktbanden bei  $1537(1)\text{ cm}^{-1}$  und  $1511(2)\text{ cm}^{-1}$ . Im synthetisierten 2.2 ps-GF-Spektrum liegen bei  $1538(1)\text{ cm}^{-1}$  und  $1514(2)\text{ cm}^{-1}$  zwei negative Lorenzkurven. Diese Positionen sind vergleichbar mit denen der Produktbanden. Es wird demnach die Entstehung zweier  $HR_K$ -Produktbanden bei  $1538\text{ cm}^{-1}$  und  $1514\text{ cm}^{-1}$  mit der kurzen Zeitkomponente beobachtet. In [Rothschild1988] wurde bei  $1514\text{ cm}^{-1}$  ebenfalls eine Produktbande beobachtet, die dem  $HR_K$ -Zustand zugeordnet wurde. Im synthetisierten 2.2 ps-GF-Spektrum zeigt sich im Bereich der Eduktbande um  $1524\text{ cm}^{-1}$  eine negative Lorenzkurve. Das bedeutet einen teilweise schnellen Rückgang des Ausgangszustandes  $HR_{578}$  mit der kurzen Zeitkomponente.

Das 8.5 ps-GF-Spektrum wird im Produktbereich um  $1538\text{ cm}^{-1}$  und  $1514\text{ cm}^{-1}$  sehr klein. Die Produktentstehung geschieht daher nur mit der schnellen Zeitkomponente. Der Rückgang

des Bleichsignals bei  $1524\text{ cm}^{-1}$  hat Anteile an der langsamen Zeitkomponente, was sich am Minimum des 8.5 ps-GF-Spektrums bei  $1525\text{ cm}^{-1}$  zeigt.

### Proteindynamik

Einen besonderen Verlauf weist die Proteindynamik im Amid-II-Bereich um  $1552\text{ cm}^{-1}$  auf. Im Kapitel 4.1.2.2 ist bereits auf diese Dynamik eingegangen worden. Hier sehen wir die Proteindynamik im Kontext der Gesamtdynamik des Ethylenbereiches. In Abb. 4.23/oben ist die gemittelte Dynamik im Bereich  $1550\text{ cm}^{-1}$  bis  $1558\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Der zeitliche Verlauf ist durch die Zeitkonstanten  $2.3(6)\text{ ps}$  und  $15(7)\text{ ps}$  geprägt. Im Vergleich hierzu ist in Abb. 4.23/unten ein Einzelfit bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  gezeigt.



**Abbildung 4.23:** H<sub>2</sub>O-HR: Oben: Dynamik im Proteinbereich, Unten: Dynamik in der Bleichbande bei  $1526\text{ cm}^{-1}$ .

Die Transiente bei  $1526\text{ cm}^{-1}$  zerfällt mit  $6(1)\text{ ps}$  und  $1.8(4)\text{ ps}$ . Die Zerfallszeiten  $6(1)\text{ ps}$  und  $15(7)\text{ ps}$  liegen außerhalb ihres einfachen Fehlerintervalls und sind somit nicht als gleiche Werte anzusehen. Sie wären aber verträglich. Die in Kapitel 4.1.2.2 untersuchte Proteindynamik am D<sub>2</sub>O substituierten Halorhodopsin wird

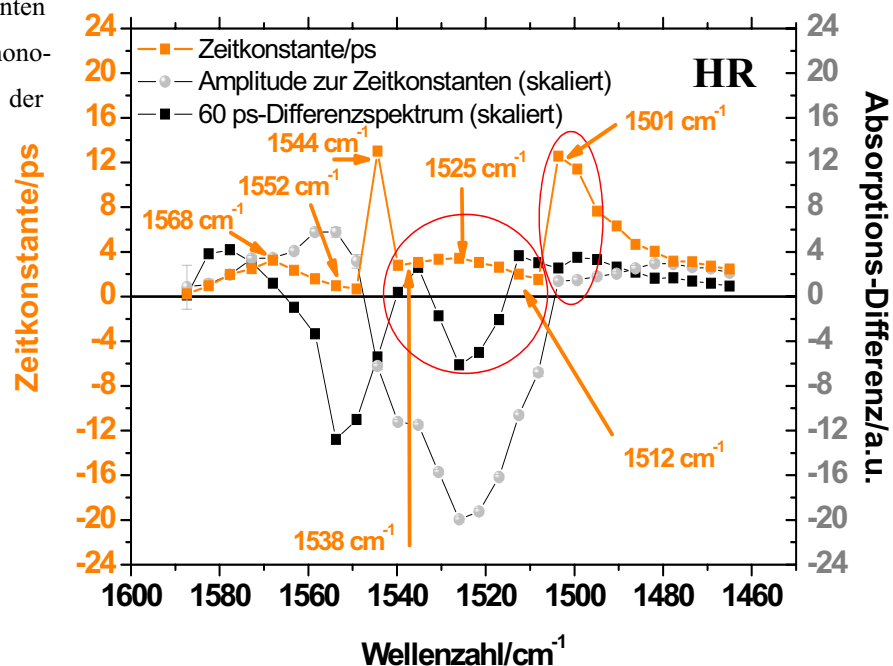


ebenfalls durch zwei Zeitkonstanten 2.6(9) und 13(5) ps bestimmt. Daher wird deutlich, dass der Rückgang des Bleichsignals in Proteinbanden langsamer verläuft als in den Chromophor-Bleichbanden. Im Proteinbereich bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  ist die 2.2 ps-Amplitude (Abb. 4.21) positiv und hat die Form einer Absorptionsbande. Aus den GF-Spektren im Proteinbereich kann man verstehen, weshalb es nicht zu einem Auftauchen des Bleichsignals in der  $T_2$ -Zeit, sondern zu einem verzögerten Anstieg innerhalb von 2.3 ps kommt: Durch den spektralen Überlapp der langsam zerfallenden Amid-II-Bleichbande mit schnell zerfallenden  $S_1$ -Banden um  $1552\text{ cm}^{-1}$  (positive Bande im 2.2 ps-GF-Spektrum) wäre die negative Protein-Bleichbande erst sichtbar, wenn die positive  $S_1$ -Bande zerfallen ist; sie entstünde somit verzögert. Ein weiterer Ansatz für die Verzögerung im Bleichbanden-Anstieg ist die Dizzipation der vom Chromophor absorbierten Energie in Proteinmoden, da dieser Vorgang mehrere Pikosekunden dauert. Die Proteinbanden aus dem Grundzustand  $HR_{578}$  verschwinden nicht genauso schnell wie die Chromophorbanden. Durch das elektrische Feld der Anregungswelle und dem damit induzierten elektrischen Dipolfeld des elektronisch angeregten Chromophors kann es zu einer Veränderung der Ladungsverteilung in der Chromophorumgebung/Proteinumgebung kommen. Das Bleichsignal würde dann auch verzögert entstehen.

### **Monoexponentielle Einzelfits der Transienten im Ethylenbereich**

Die Ergebnisse aus dem Ethylenbereich werden in Abb. 4.24 in einer übersichtlichen Darstellung gezeigt. Dabei wurden für die Transienten monoexponentielle Einzelfits durchgeführt. Dadurch erhält man wie im Fingerprintbereich ein Gefühl für die mittlere Größe der Zeitkonstante. Aus Abb. 4.24 werden viele Zusammenhänge klar: Im Bereich der Ethylenbleichbande bei  $1525\text{ cm}^{-1}$  hat die Zeitkonstante ein lokales Maximum. Der Rückgang des Bleichsignals dauert also relativ lang. In den Produktbereichen bei  $1538\text{ cm}^{-1}$  und  $1511\text{ cm}^{-1}$  hat die Zeitkonstante lokale Minima. Die Produktentstehung geschieht also mit einer kurzen Zeitkonstante. Bei  $1501\text{ cm}^{-1}$  wird die Zeitkonstante sehr groß. Dort ist die Dynamik wahrscheinlich von einem langsamen Zerfall einer Spezies im  $S_1$ -Zustand geprägt. Unterhalb von  $1501\text{ cm}^{-1}$  wird die Zeitkonstante wieder kleiner, gehört aber aufgrund des positiven Vorzeichens der Amplitude für die Zeitkonstante stets zum Zerfall einer Spezies. Bei  $1544\text{ cm}^{-1}$  hat die Zeitkonstante ein globales Maximum. Hier hat der sehr langsame

**Abbildung 4.24:** Zeitkonstanten im Ethylenbereich aus mono-exponentiellen Einzelfits der Transienten (HR).



Zerfall der Proteinbande den größten Einfluss. Bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  hat die Zeitkonstante ein lokales Minimum. Es dominiert die Amplitude in den GF-Spektrum der kurzen Zeitkonstante 2.2 ps: Durch den monoexponentiellen Fit werden frühe Zeitpunkte mehr berücksichtigt, und anfangs zerfällt das Signal im Proteinbereich mit ca. 2.2 ps, was zu einem verzögerten Bleichsignal führt. Bei  $1568\text{ cm}^{-1}$  liegt wiederum ein lokales Maximum der Zeitkonstante. Hier ist der langsame Zerfall einer Spezies im  $S_1$ -Zustand zu beobachten. Zum hochenergetischen Rand des betrachteten Frequenzbereiches wird die Zeitkonstante wieder kleiner. Zusammengenommen mit der positiven Amplitude für die Zeitkonstante bedeutet das den schnellen Zerfall einer  $S_1$ -Spezies.

### Heiße Schwingungsbanden

Wenn Schwingungsdynamik beobachtet wird, stellt sich auch immer die Frage nach heißen Schwingungsbanden. Bei Bakteriorhodopsin (bR) z. B. werden von den 2 eV des Anregungsphotons (570 nm) nur 0.5 eV im Produktzustand gespeichert [Birge1990]. Für PSBR liegt dieser Wert bei 0.5 eV bei einer Anregungsenergie von 2.3 eV [Hamm1997]. Nach der Photoanregung verteilt sich die Anregungsenergie mit unterschiedlicher Gewichtung

intramolekular über alle Schwingungsmoden des Moleküls. Es entstehen heiße Schwingungsbanden, die sich im Laufe der Zeit wieder abkühlen. Durch intermolekularen Energietransfer wird ein Teil der Anregungsenergie an die Umgebung des Moleküls abgegeben. Bei PSBR ist das ca. 1.2 eV. Die heißen Schwingungsbanden haben eine kurze Lebensdauer von wenigen Pikosekunden. Beim bR liegt der Wert bei ca. 1 ps -2 ps für die Abkühlung des heißen Ausgangszustandes (nach Photoanregung) und 3 ps für die Abkühlung des Photoproduktes  $bR_J$  zum Produktzustand  $bR_K$  [Herbst2002/I]. Für PSBR wird auch eine Zeit für die Abkühlung zwischen 2 ps und 7.2 ps angenommen. Die in [Hamm1997] für PSBR beobachtete kurze Zeitkomponente von 2 ps wird jedoch nicht der Zeit für die Abkühlung des heißen Grundzustandes zugeordnet, sondern der Entstehungszeit des heißen Grundzustandes. Für Halorhodopsin könnte im Einklang mit den Ergebnissen an bR und den Messungen an PSBR ebenfalls eine Zeit für die Schwingungsabkühlung angenommen werden, die zwischen 2.2 ps und 8.5 ps liegt, wegen der großen Ähnlichkeit zum bR jedoch näher an 2.2 ps. In [Kandori1992][Kandori1993/II] wird für  $HR_J \rightarrow HR_K$ -Übergang eine Zeit für die Schwingungsabkühlung von ca. 3 ps, i. w.  $\tau_{cool}^{J \rightarrow K}$ , vorgeschlagen, obwohl hier die Abkühlung schwer zu beobachten bzw. nachzuweisen war.

Unsere bisherigen Ergebnisse sprechen für eine Verzweigungsreaktion im elektronisch angeregten Zustand in einen reaktiven Pfad (Isomerisierungscoordinate), der zum Photoprodukt  $HR_K^{COLD} = HR_{600}$  führt, und einem nicht-reaktiven Pfad, von wo aus das  $S_1$ -Intermediat  $S_1^{loss}$  (loss= Verlust, da dieser Teil ja nicht in die Produktentstehung geht) sofort wieder zum eventuell heißen Grundzustand  $S_0^{HOT}$  zerfällt. Dieser heiße Grundzustand könnte dann durch Schwingungsabkühlung mit  $\tau_{cool} \geq 2$  ps in den kalten Grundzustand  $S_0^{COLD} = HR_{578}$  übergehen. Die Verbreiterung des 1.8 ps-GF-Amplitudenspektrums z. B. im Fingerprintbereich (Abb. 4.15) in Richtung der Eduktbanden kann als ein Hinweis auf einen teilweisen Übergang des  $S_1$ -Zustandes  $S_1^{iso}$  mit der schnellen Zeitkomponente in den Grundzustand verstanden werden. In der Folgereaktion erster Ordnung (vgl. 4.1.2.3 Analyse der Transienten mittels Global Fit (GF) und Singular Value Decomposition (SVD))  $S_1^{loss} \xrightarrow{(7.7 \text{ ps})^{-1}} S_0^{HOT} \xrightarrow{(\tau_{cool})^{-1}} S_0^{COLD} = HR_{578}$  (Reaktion I) kann zumindest direkt in den Edukt-Bleichbanden die  $\tau_{cool}$ -Zeitkomponente schwer beobachtet werden. Die größere Zeitkonstante 7.7 ps bzw. kleinere Übergangsrate  $(7.7 \text{ ps})^{-1}$  ist immer die besser beobachtbare Dynamik in einer solchen Folgereaktion. Beim HR und vielleicht auch beim PSBR [Hamm1996] geht

aus dem  $S_1$ -Zustand  $S_1^{iso}$  ein Teil der Spezies mit  $\sim 2$  ps direkt in den Grundzustand über. Das

entspricht einem Teil-Reaktionsschema  $S_1^{iso} \xrightarrow{(2\text{ ps})^{-1}} S_0^{HOT} \xrightarrow{(\tau_{cool})^{-1}} S_0^{COLD} = HR_{578}$  (Reaktion II).

Es werden demzufolge heiße Grundzustandsmoleküle innerhalb 2 ps gebildet<sup>1</sup>. Danach beginnen diese Moleküle durch intermolekularen Energieaustausch abzukühlen. Zur gleichen Zeit entstehen heiße Grundzustandsmoleküle mit der 7.7 ps-Komponente. Die langsamere Komponente, die mit der Rückbildung des Grundzustandes verbunden ist, beschreibt das Abklingen der mittleren molekularen Temperatur. Die Verbindung zwischen der Abkühlung und der Zeitkonstante des späten elektronischen Zerfalls (7.7 ps) ist somit eine Koinzidenz, also zufälliger Natur. Dennoch kann die Korrelation zwischen beiden Prozessen erklärt werden, wenn man annimmt, dass die Zeit für die Schwingungsabkühlung  $\tau_{cool}$  in einem angemessenen Fenster  $2\text{ ps} \leq \tau_{cool} \leq 7.7\text{ ps}$  liegt: In diesem Fall ist die beobachtete Rate für die Abkühlung ähnlich der Formationsrate  $(7.7\text{ ps})^{-1}$  und nicht die wirkliche physikalische Rate  $(\tau_{cool})^{-1}$ . Die positive Bande im 8.5 ps-GF-Spektrum unterhalb von  $1510\text{ cm}^{-1}$  könnte demnach wirklich die Schwingungsabkühlung des heißen Grundzustandes indirekt wiedergeben und auch die GF-Amplitudenspektren im Fingerprintbereich unterhalb  $1162\text{ cm}^{-1}$  sprechen für eine Schwingungsabkühlung von heißen Eduktbanden. Betrachtet man hingegen die mögliche Produktreaktion

$S_1^{iso} \xrightarrow{(2\text{ ps})^{-1}} HR_J^{HOT} \xrightarrow{(\tau_{cool}^{J \rightarrow K})^{-1}} HR_K^{COLD} = HR_{600}$ , so wird klar, dass die schnelle Entstehung des

heißen Produktzustandes  $HR_J^{HOT}$  innerhalb 2 ps in dem 2.2 ps-GF-Spektrum nicht spektral trennbar wäre mit dem Zerfall von  $HR_J^{HOT}$  zum kalten Produktzustand  $HR_K^{COLD} = HR_{600}$ , da die Abkühlung wahrscheinlich durch eine ähnliche Zeitkonstante  $\tau_{cool}^{J \rightarrow K} > 2.2\text{ ps}$  bestimmt ist.

Im Ethylenbereich würde es somit zu einer Kompensierung der Entstehung und des Zerfalls des heißen Produktzustandes in dem 2.2 ps-GF-Spektrum kommen, und die Schwingungsabkühlung des heißen Produktzustandes wäre in den GF-Spektren nicht beobachtbar. Der J-Zustand kann nicht unabhängig beobachtet werden, denn eine Komponente des Zerfalls des angeregten elektronischen Zustandes läuft langsamer ab, so dass eine Auftrennung nicht möglich ist. Beim bR konnte die Entstehung und der Zerfall des heißen Produktzustandes beobachtet werden, denn die Entstehungszeit von  $bR_J$  war mit 500 fs deutlich kleiner als die Zeit für dessen Zerfall (3 ps). Somit konnten in den GF-

---

<sup>1</sup> Für die Dynamik werden die gemittelten Zeitkonstanten aus den bisherigen Messungen, 2.0(1) ps und 7.7(5) ps verwendet.

Spektren für bR die Entstehung und der Zerfall des heißen Produktzustandes  $bR_J$  gut separiert werden [Herbst2002/I].

Trotz dessen sieht man für die zeitliche Entwicklung des Differenzspektrums im Ethylenbereich Ähnlichkeiten zu einigen in Kapitel 2.1.3 besprochenen Charakteristika rot verschobener, heißer Schwingungsbanden, zumindest in Bezug auf die Verlagerung des Schwerpunktes der Produktbande hin zu höheren Energien im Laufe der Zeit. In Abb. 4.25 sind IR-Differenzspektren zwischen  $1460\text{ cm}^{-1}$  und  $1520\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Schwingungsabkühlung erwartet man unterhalb von  $\sim 1511\text{ cm}^{-1}$  ( $HR_K$ -Produktbande). Der Schwerpunkt der positiven Bande verlagert sich im Laufe der Zeit bis etwa 15 ps mehr und mehr zu einer höherenergetischen Position. Gegen die Beobachtung heißer Schwingungsbanden spricht jedoch die für eine Schwingungsabkühlung untypische Verkleinerung der Amplitude der Bande. Betrachtet man die GF-Amplituden-Spektren in diesem Bereich (Abb. 4.21), so ließen sich die Verschiebungen auch durch den Zerfall der  $S_1$ -Banden  $S_1^{iso}$  und  $S_1^{loss}$  erklären, was hier für die wahrscheinlichere Variante gehalten wird. In Abb. 4.26 ist ein Ausschnitt der GF-Spektren zwischen  $1460\text{ cm}^{-1}$  und  $1520\text{ cm}^{-1}$  im Ethylenbereich gezeigt, der einen möglichen Zerfall von  $S_1$ -Banden in diesem Bereich verdeutlicht.

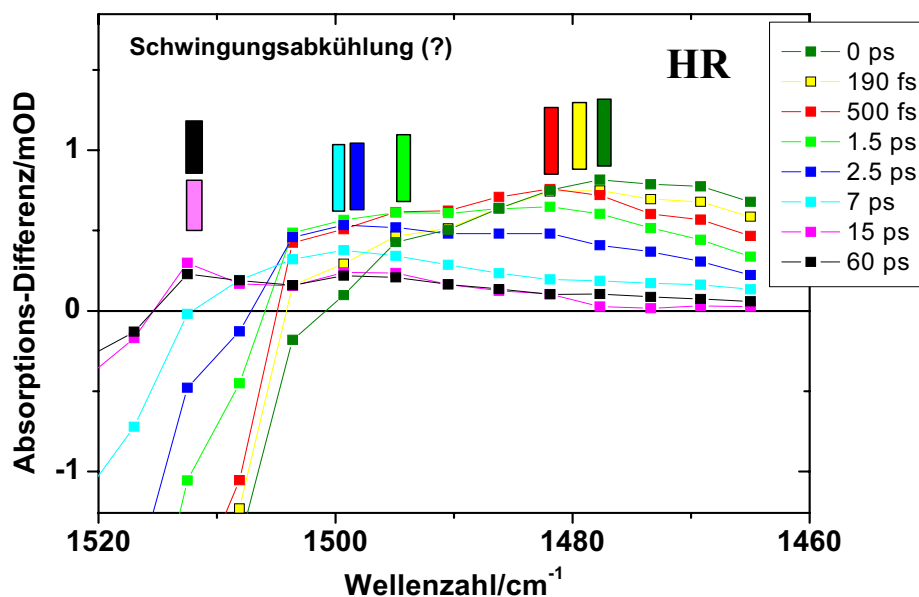


Abbildung 4.25: HR: Zeitliche Entwicklung der positiven Differenzbande im Ethylenbereich. Die farbigen Balken markieren die Maxima der positiven Banden.

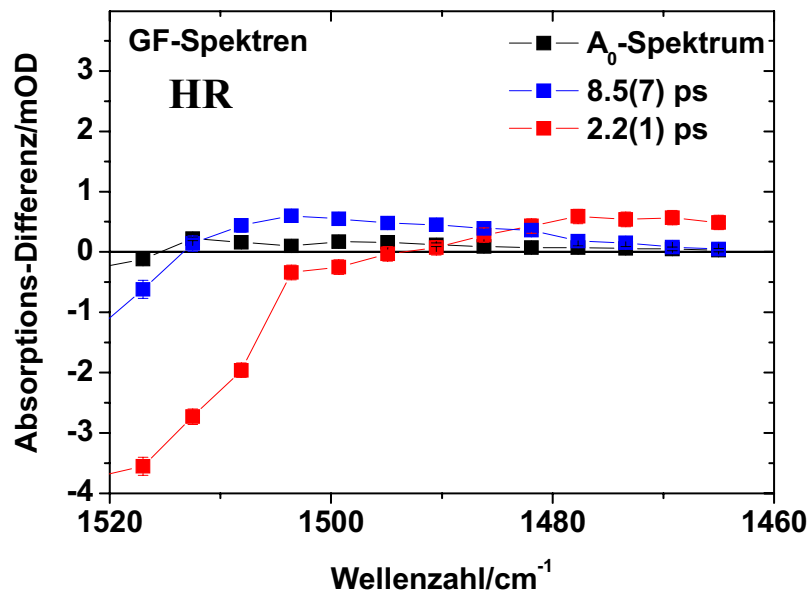


Abbildung 4.26: HR: GF-Amplitudenspektren im Ethylenbereich zwischen 1460 cm<sup>-1</sup> und 1520 cm<sup>-1</sup>.

Die Ergebnisse aus den Messungen im Ethylenbereich geben deutliche Hinweise auf eine schnelle Produktentstehung zum  $HR_K$  mit ca. 2.2 ps und einer langsamen und schnellen Wiederkehr des Ausgangszustandes  $HR_{578}$  mit ca. 8.5 ps respektive 2.2 ps. Außerdem spricht vieles für einen biphasischen Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$ . Schwingungsabkühlung heißer Produktzustände konnte nicht eindeutig beobachtet werden. Es gibt nur schwache Hinweise auf Abkühlung eines heißen Eduktzustandes.

### Spektralbereich der C=ND-Streckschwingung („Schiffsche Base-Bereich“)

Es wurde die Dynamik im Spektralbereich der C=ND-Streckschwingung („Schiffsche Base-Bereich“) untersucht. Es ist eine gängige Methode,  $H_2O$  durch  $D_2O$  zu substituieren, um im „Schiffsche Base-Bereich“ noch über eine endliche Infrarot-Transmission zu verfügen, denn dort absorbiert gerade  $H_2O$  sehr stark. Die Absorption von  $D_2O$  ist hier schwächer. Die Frequenz der C=NH-Streckschwingung bei 1636 cm<sup>-1</sup> verschiebt sich bei der C=ND-Streckschwingung auf 1622 cm<sup>-1</sup> (siehe Abb. 4.6) und ergibt sich fast allein aus der Massendifferenz. Aufgrund dieser Massendifferenz läge die Verschiebung bei ca. 10 cm<sup>-1</sup> [Aton1980][Argade1981]. Um zu untersuchen, inwieweit sich die Dynamik nach der

Substitution durch das schwerere Deuteron verändert, wurden vorab vergleichende Messungen im Ethylenbereich durchgeführt. In Abb. 4.27 sind für eine D<sub>2</sub>O-HR-Probe (rechts) und eine H<sub>2</sub>O-HR-Probe (links) die Spektren im Ethylenbereich zu verschiedenen Zeiten gezeigt. Im direkten Vergleich der Spektren wird ein Unterschied deutlich: In den sehr frühen Differenzspektren, z. B. bei 0 ps oder 190 fs, ist die bei der H<sub>2</sub>O-HR-Probe ausgeprägte Schulter um 1538 cm<sup>-1</sup> bei der D<sub>2</sub>O-HR-Probe kaum zu erkennen. Es gibt die Überlegung, dieser Schulter einer Spezies aus dem Grundzustand zuzuordnen, deren Retinalchromophor eine (13-cis, 15-syn)-Konfiguration aufweist (vgl. Kapitel 4.1.3) [Gerscher1997]. In Resonanz Raman-Messungen an D<sub>2</sub>O-pHR war diese Bande ebenfalls nicht beobachtbar [Gerscher1997].

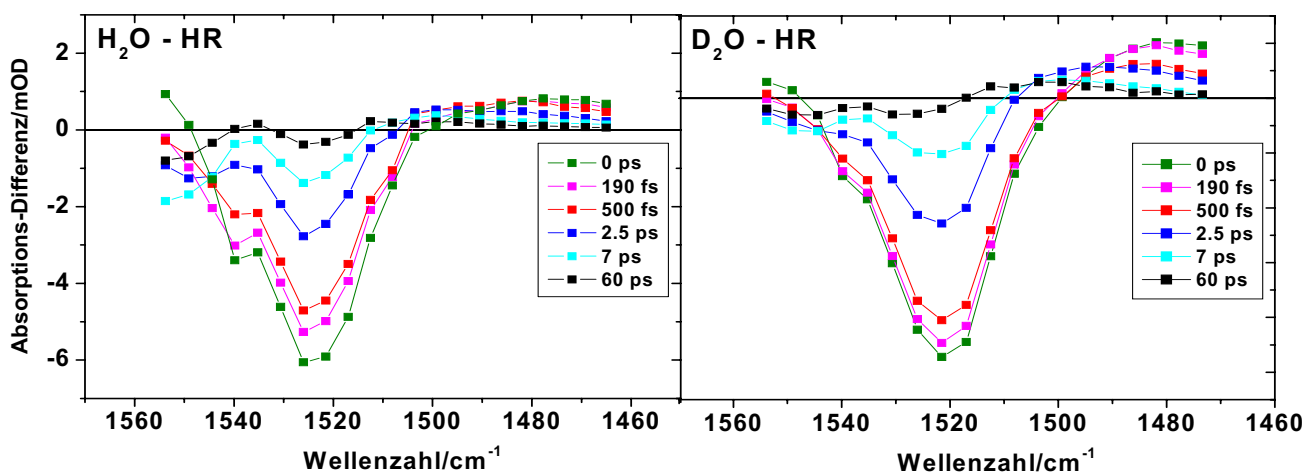


Abbildung 4.27: IR-Differenzspektren im Ethylenbereich: H<sub>2</sub>O-HR-Probe (links) und D<sub>2</sub>O-HR-Probe (rechts).

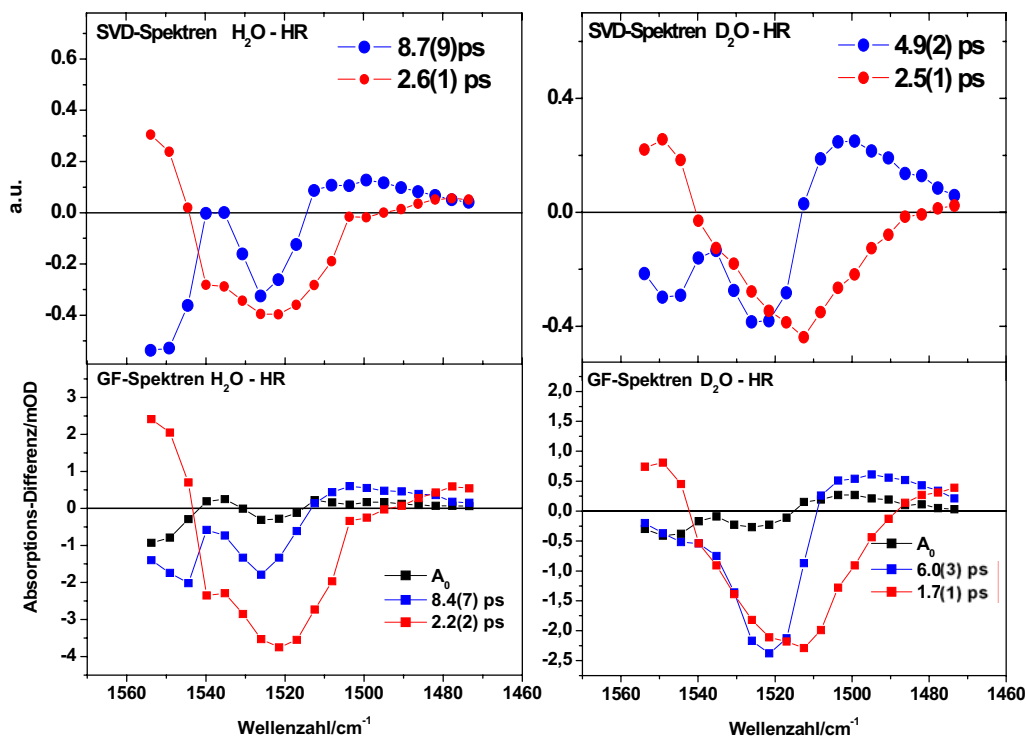
Beim D<sub>2</sub>O-HR entsteht bei 1538 cm<sup>-1</sup> kein Produkt mehr. Für die Produktbande bei 1538 cm<sup>-1</sup> beim H<sub>2</sub>O-HR wird in der Literatur einer spektralen Verschiebung der Amid-II-Bande im K-Zustand zugeordnet, also einer veränderten C-N-Streckschwingung des Peptidgerüsts im K-Zustand [Rothschild1988]. Aufgrund des Fehlens dieser Produktbande beim D<sub>2</sub>O-HR, stellt sich die Frage, ob sich die Substitution mit D<sub>2</sub>O auf die Proteinreaktion auswirkt.

#### GF und SVD-Analyse im „Ethylenbereich“ der D<sub>2</sub>O-HR-Probe

In Abb. 4.28 sind die globalen Fits und die SVD-Spektren für H<sub>2</sub>O-HR und D<sub>2</sub>O-HR im Ethylenbereich gegenübergestellt. Es ergeben sich doch einige Unterschiede: Die Position des Minimums des 1.7 ps-GF-Spektrums verschiebt sich bei D<sub>2</sub>O-Substitution von ~ 1522 cm<sup>-1</sup> auf ~ 1512 cm<sup>-1</sup>. Auch ist das 6.0 ps-GF-Spektrum der D<sub>2</sub>O-HR-Probe in der

Bleichbande bei  $1524\text{ cm}^{-1}$  stärker ausgeprägt. Ein weiterer Unterschied ist im Bereich der Proteindynamik um  $1552\text{ cm}^{-1}$ : Hier hat das  $6.0\text{ ps}$ -GF-Spektrum der  $\text{D}_2\text{O}$ -HR-Probe kein ausgeprägtes Minimum in Form einer Absorptionsbande, obschon der Einzelfit bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  eine langsame Komponente von  $(22 \pm 10)\text{ ps}$  aufweist.

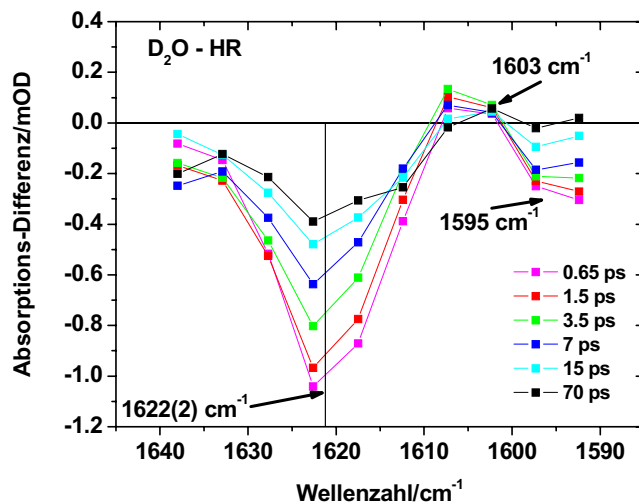
Auch beim  $\text{D}_2\text{O}$ -HR entsteht das Produkt um  $1511\text{ cm}^{-1}$  mit der schnellen Zeitkomponente, und der Rückgang der Edukt-Bleichbande geschieht ebenfalls mit der langsamen und einem relativ kleinen Anteil der schnellen Zeitkomponente.



**Abbildung 4.28:** GF-Amplitudenspektren und SVD-Spektren im Ethylenbereich zwischen  $1460\text{ cm}^{-1}$  und  $1520\text{ cm}^{-1}$  einer  $\text{H}_2\text{O}$ -HR-Probe (links) und einer  $\text{D}_2\text{O}$ -HR-Probe (rechts).

Nach diesen Vorbetrachtungen werden nun die Messungen der C=ND-Streckschwingung

**Abbildung 4.29:** IR-Differenz-Spektren zu verschiedenen Zeiten einer  $\text{D}_2\text{O}$ -HR-Probe im Spektralbereich der C=ND-Streckschwingung.





(„Schiffsche Base-Bereich“) diskutiert. In Abb. 4.29 sind die Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten zu sehen. Die Transienten werden erst ab 600 fs betrachtet, da zu frühen Zeiten leider ein nicht-kohärenter Fenstereffekt aufgrund zu hoher Pumpleistung aufgetaucht ist (vgl. Kapitel 2.2.4). Bei  $1622(2) \text{ cm}^{-1}$  liegt die Bleichbande der C=ND-Streckschwingung des Grundzustandes. Resonanz-Raman-Messungen an HR ergaben eine Bande bei  $1623(1) \text{ cm}^{-1}$  [Maeda1985]. Der hier gefundene Wert ist mit diesem innerhalb des Fehlers gleich. Die Bleichbande bei  $1595 \text{ cm}^{-1}$  wird auch in der zuletzt genannten Literaturreferenz und in [Smith1984] gefunden. Sie wird einer  $\text{C}_5=\text{C}_6$ -Ethylenstreckschwingung zugeordnet [Diller1987]. Beim  $\text{H}_2\text{O}$ -HR lag um  $1606 \text{ cm}^{-1}$  eine schwache, positive Differenz-Bande (Abb. 4.7). Sie wird der C=NH-Streckschwingung des  $\text{HR}_K$ -Intermediates zugeordnet [Rothschild1984]. Bei Substitution mit  $\text{D}_2\text{O}$  verschwindet diese Bande, was die Zuordnung zu einer protonierten Schiffschen-Base untermauert [Rothschild1988]. Um  $1603 \text{ cm}^{-1}$  ist zu späten Zeiten ein sehr schwaches, positives Differenzsignal zu sehen (Abb. 4.29). Dort ist auch ein isosbestischer Punkt. Eine eindeutige Produktbande ist im gemessenen Frequenzbereich nicht zu erkennen.

#### **GF und SVD-Analyse im „Schiffsche Base-Bereich“ (C=ND-Streckschwingung)**

Betrachten wir die Ergebnisse des GF und der SVD-Analyse des C=ND-Spektralbereiches in Abb. 4.30. Zu dem relevantesten SVD-Spektrum gehört eine Transiente, die sich mit der Zeitkonstante  $8.5(7) \text{ ps}$  anfitzen läßt. Das zweit-relevanteste Spektrum korrespondiert zu einer Transienten, die mit der Zeitkonstante  $2.0(2) \text{ ps}$  zerfällt.

Beim Vergleich von SVD-Analyse und GF sieht man viele Ähnlichkeiten zwischen den entsprechenden Spektren. Bei  $1622 \text{ cm}^{-1}$  und  $1595 \text{ cm}^{-1}$  haben die Spektren für die lange Zeitkomponente lokale Minima. Der Rückgang des Ausgangszustandes geschieht also mit der langen Zeitkomponente. Die Positionen der Maxima in den Spektren der langen Zeitkomponente liegen bei jeweils  $\sim 1608 \text{ cm}^{-1}$ . Auch die Spektren für die kurze Zeitkomponente haben eine gleiche Systematik: Beide Spektren zeigen bei  $1613 \text{ cm}^{-1}$  ein lokales Minimum. Die SVD-Analyse und der GF bestätigen sich gegenseitig ihre Ergebnisse.

In den Bleichbanden findet sich im Gegensatz zu den Messungen am  $\text{H}_2\text{O}$ -HR kein schneller Zerfall mit  $2 \text{ ps}$ . Bei der Messung am  $\text{D}_2\text{O}$ -HR im Ethylenbereich (Abb. 4.28) zeigten sich in der Bleichbande um  $1525 \text{ cm}^{-1}$  deutlich Anteile der schnellen

Komponente. Eine mögliche Erklärung wäre die Überlagerung des Rückganges des Bleichsignals mit dem schnellen Zerfall einer Spezies aus dem  $S_1$ -Zustand, so dass es zu einer Kompensation der schnellen Komponente kommt.

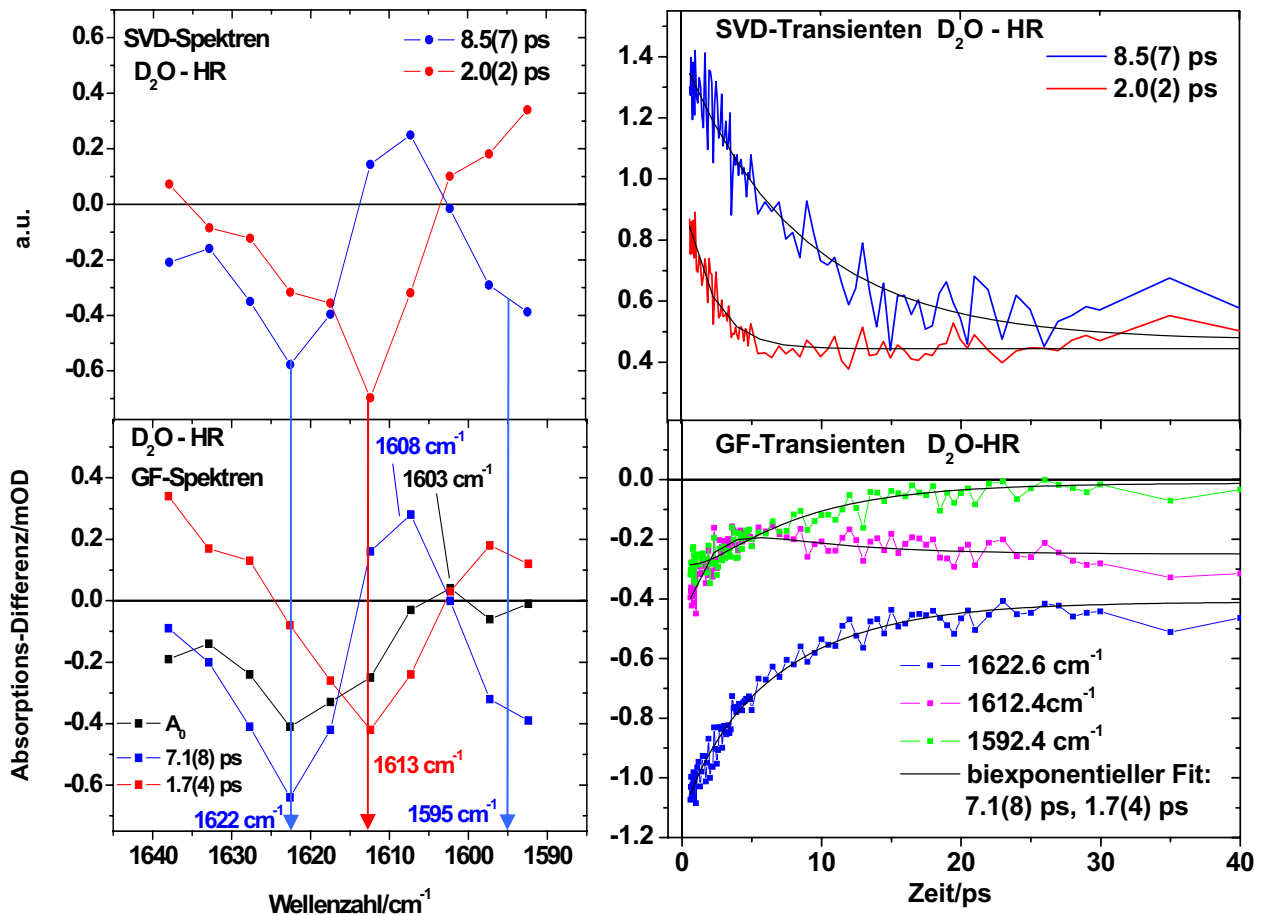


Abbildung 4.30: D<sub>2</sub>O-HR: SVD-Analyse und Global-Fit des C=ND-Spektralbereiches.

Wir haben im C=ND-Bereich des D<sub>2</sub>O-HR keine eindeutige Produktbande gefunden (vgl. Abb. 4.29). Für ähnliche Messungen an Bakteriorhodopsin (H<sub>2</sub>O-bR) gab es die Überlegung, dass die 13-cis-C=NH-Streckschwingungsbande entweder sehr breit, von geringer Oszillatorstärke, oder mit anderen Moden koppelt [Herbst2002/I]. Hier war die Produktbande gegenüber der Bleichbande verhältnismäßig klein und entsprach nicht dem Wert, der sich aus der hohen Quantenausbeute des bR, die bei ca. 64 % liegt, ergeben sollte.

### Quanteneffizienz der Photoreaktion

Im C=ND-Bereich einer D<sub>2</sub>O – HR-Probe beobachteten wir einen langsamen Rückgang des

Bleichsignales auf ca. 37(8) % des Ausgangswertes zu frühen Zeiten (Abb 4.29). Die Quanteneffizienz für die Photoreaktion läge demzufolge bei 37(8) %, was mit Angaben aus der Literatur von ca. 34 % verträglich ist [Oesterhelt1985]. Der Unterschied der um den Faktor zwei geringeren Quanteneffizienz des HR im Vergleich zu bR wird mit den verschiedenen Aminosäuren in der Nähe der Schiffischen Base erklärt: Die Asparaginsäure Asp<sub>85</sub> beim bR ist geladen und bildet das diffuse Gegenion zur Schiffischen Base. Im Gegensatz hierzu liegt beim HR die Aminosäure Threonin Thr<sub>111</sub>, die ungeladen ist. Asp<sub>85</sub> fungiert beim bR als stabilisierendes Element für die protonierte Schiffische Base und als deren Protonenakzeptor [Mogi1988][Braiman1988][Gerwert1989]. Die Abschwächung der elektrostatischen Wechselwirkung beim bR zwischen dem ionisierendem Asp<sub>85</sub> und der protonierten Schiffischen Base im angeregten Zustand wird zu einer relativen Erleichterung der Bewegung der protonierten Schiffischen Base führen, was in eine effiziente Isomerisierung über die C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung des Retinalchromophors mündet [Kandori1993/II]. Ein „Austausch“ zwischen Asp und Thr könnte daher den Unterschied in der Quanteneffizienz erklären. bR läßt sich durch einen Austausch von der geladenen Aminosäure Asp<sub>85</sub> mit einer ungeladenen Asparaginsäure zu einer HR-artigen Chloridionenpumpe umwandeln. Beim Austausch von Asp<sub>85</sub> gegen Threonin wird bR ebenfalls zur Chloridionenpumpe, wenn auch, aufgrund der geringen Chlorid-Affinität auf der Bindungsseite, zu einer ineffizienten [Sasaki1995]. HR hingegen wird durch einen Austausch mit einer geladenen Asparaginsäure zu einer Protonenpumpe [Hamm1996]. Für das veränderte bR kommt es zu einer drastischen Verlangsamung der Photoreaktion und resultiert in einer biexponentiellen Reaktion mit den Zeitkonstanten 2 und 10 ps, ganz gleich wie beim HR [Song1993].

#### **GF und SVD-Analyse im gesamt gemessenen Spektralbereich einer D<sub>2</sub>O-HR-Probe**

Alle für die D<sub>2</sub>O-Probe aufgenommenen Daten, also aus dem Bereich der Schiffischen Base, dann um 1563 cm<sup>-1</sup> (noch nicht gezeigt) und im Ethylenbereich werden durch einen globalen Fit und die SVD-Analyse ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abb. 4.31 zusammenfassend dargestellt. Das SVD- und das GF-Spektrum der langen Zeitkomponenten haben große Ähnlichkeit. Das SVD-Spektrum für die kurze Zeitkomponente hat sich im Frequenzbereich der Schiffischen Base durch die Gesamtbetrachtung aller Transienten verändert. Die negative Bande liegt nun bei 1605 cm<sup>-1</sup> anstatt bei 1613 cm<sup>-1</sup> aus der SVD-Analyse für den Schiffische Base-Bereich allein (Abb. 4.30). Aufgrund der

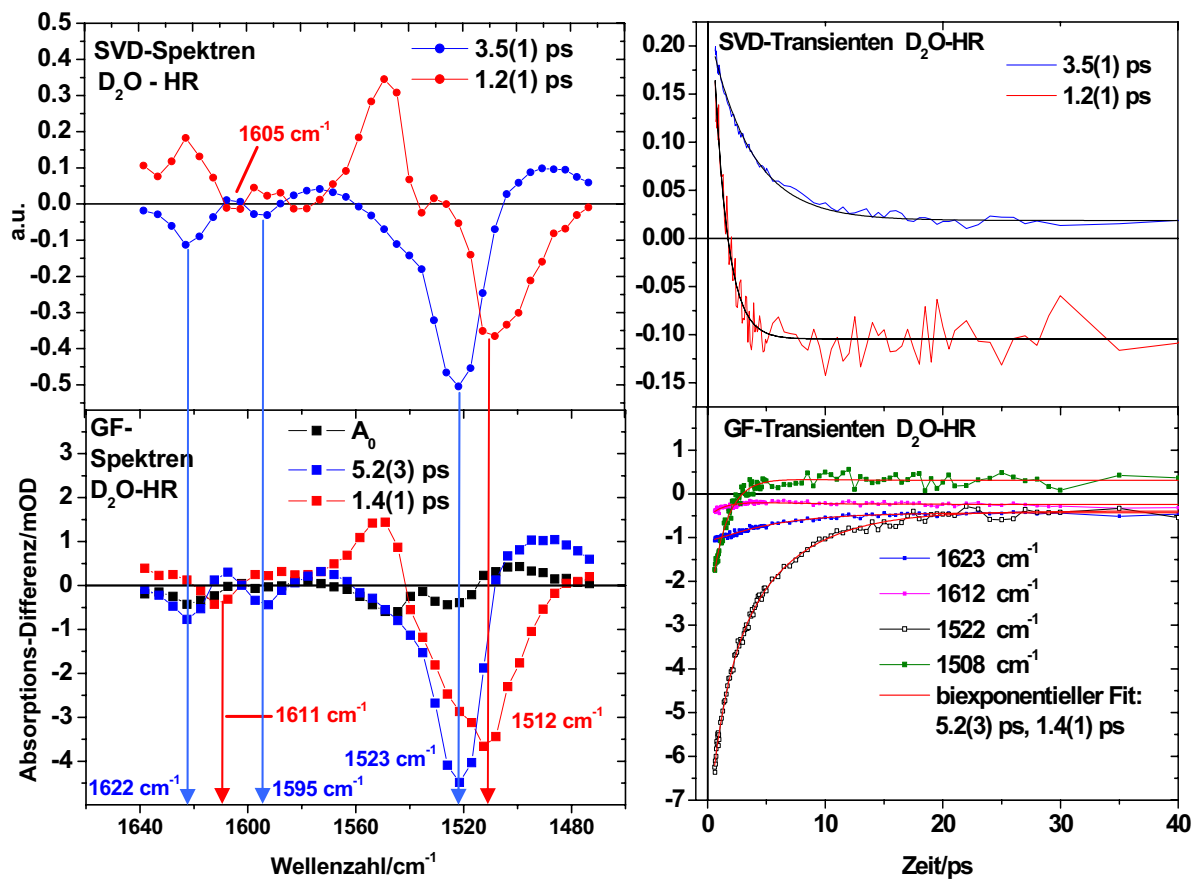


Abbildung 4.31: D<sub>2</sub>O-HR: Global-Fit und SVD-Analyse für den gesamt gemessenen Spektralbereich.

Ähnlichkeiten zwischen den Ergebnissen der SVD-Analyse und des Global-Fits bestätigen sich beide Methoden gegenseitig ihre Ergebnisse: Die Dynamik kann mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden.

Die Ergebnisse im Schiffische Base-Bereich sind als die spezielle Dynamik einer mit D<sub>2</sub>O substituierten HR-Probe zu betrachten. Man kann daraus keine direkten Rückschlüsse ziehen, wie sich eine H<sub>2</sub>O-HR-Probe im Frequenzbereich der C=NH-Streckschwingung verhalten hätte, da wir eine abweichende Dynamik der D<sub>2</sub>O-HR-Probe im Vergleich zur H<sub>2</sub>O-HR-Probe im Ethylenbereich gefunden haben.

#### 4.1.2.5 Modell zur Primärreaktion

In diesem Kapitel soll sukzessive ein Reaktionsmodell für die Primärschritte der Photoreaktion von Halorhodopsin aufgestellt werden. Während der Primärreaktion führt der Retinalchromophor des HR eine all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung um die C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung durch.

#### Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes S<sub>1</sub>

Aus unseren vorbereitenden Messungen mit optischer fs-Spektroskopie wurde bereits deutlich, dass der Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes über zwei Zeitkonstanten abläuft, respektive 6.8 ps und 1.4 ps (Abb. 4.2). Zusätzlich wurde noch eine ultrakurze Zeitkonstante von 0.3(1) ps gefunden, die nach [Warshell1991] einer gedämpften Bewegung im elektronisch angeregten Zustand zugewiesen wird. Das Verhältnis der Amplituden der 6.8 ps-Komponente zur 1.4 ps -Komponente liegt bei unseren Messungen bei ca. 0.7(2). Auch bei den Messungen mit transientser Infrarot-Schwingungsspektroskopie zeigten sich für den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes zwei verschiedene Zeitkonstanten: Bei 1149 cm<sup>-1</sup> zerfällt der S<sub>1</sub>-Zustand mit 9(2) ps, bei 1563 cm<sup>-1</sup> ist der Zerfall schnell mit 2.4(3) ps (Abb. 4.8). Es spricht daher vieles für einen biphasischen Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes in einen reaktiven (C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Isomerisierungsordinate) und einen nicht-reaktiven Pfad auf der S<sub>1</sub>-Oberfläche<sup>1</sup>. Nach der Photoanregung wird zuerst der Franck-Condon-Zustand erreicht, der dann innerhalb der ultrakurzen Zeit 0.3 ps in zwei relaxierte S<sub>1</sub>-Zustände S<sub>1</sub><sup>loss</sup> und S<sub>1</sub><sup>iso</sup> zerfällt<sup>2</sup>, wobei S<sub>1</sub><sup>loss</sup> einer nicht-reaktiven Spezies zugeordnet wird, die wieder direkt in den Grundzustand übergeht. Von S<sub>1</sub><sup>loss</sup> wird angenommen, dass der Retinalchromophor in all-trans-Konfiguration vorliegt [Kandori1992]. S<sub>1</sub><sup>iso</sup> stellt die reaktive Spezies dar, die in das Photoprodukt HR<sub>K</sub> mit vollständig 13-cis-isomerisiertem Retinalchromophor übergeht.

<sup>1</sup> Über die Natur der Koordinate des nicht-reaktiven Pfads ist noch nichts Genaues bekannt. Es könnte sich dabei z. B. um eine hochfrequente C=C-Streckschwingungsmode handeln (vgl. Kapitel 4.3.2). Für bR wurde auch eine ultraschnelle Dynamik (~ 150 fs) des Systems im S<sub>1</sub> beobachtet [Zinth2001].

<sup>2</sup> Bei unseren vorbereitenden Messungen mit optischer fs-Spektroskopie mit einer Systemantwort von nur 50 fs beobachteten wir bei einer Probewellenlänge von 687 nm wie auch Arlt et. al [Arlt1995] eindeutig die ultrakurze Zeitkomponente von 0.3(1) ps. In den VIS/IR-Experimenten konnte die ultrakurze Zeitkonstante nicht zweifelsfrei verifiziert werden (Anhang/Ergänzungen zur Auswertung).

Es sollen an dieser Stelle zwei bereits existierende Reaktionsmodelle zur Primärreaktion von HR [Kandori1992][Kandori1993/I][Arlt1995] kurz vorgestellt werden.

In [Kandori1992] wird auf der Grundlage von Messungen mit optischer fs-Spektroskopie ein direkter Zerfall vom Franck-Condon-Zustand zum Photoprodukt  $HR_f$  in  $\leq 1$  ps angenommen. In derselben Referenz wird ein zusätzlicher, relaxierter Zustand auf der  $S_1$ -Potentialoberfläche eingeführt, der mit 2.3 ps direkt wieder in den Grundzustand übergeht. Diese Annahmen passen nicht zu unseren Ergebnissen, denn wir beobachten einen biphasischen Zerfall des  $S_1$  mit den Zeitkomponenten 2.0(1) ps und 7.7(5) ps. Ausserdem gibt es Anzeichen für eine ultrakurze Zeitkomponente, die für den Zerfall des Franck-Condon-Zustandes steht, in [Polland1985] oder auch in [Kandori1993/I] aufgrund kleinerer Zeitauflösung, 3 ps und 0.6 ps respektive, jedoch nicht gefunden wurde.

Ein weiteres Reaktionsmodell stammt von Arlt et al.. Hier wird ein biphasischer Zerfall des  $S_1$  angenommen. In ihren Messungen mit optischer fs-Spektroskopie wurde die ultrakurze Zeitkomponente ebenfalls gefunden [Arlt1995].

Für PSBR wird nach Photoanregung interessanterweise auch eine Aufspaltung in zwei Spezies auf der  $S_1$ -Oberfläche angenommen [Hamm1996]. PSBR führt eine all-trans- zu 11-cis-Isomerisierung mit einer Quantenausbeute von 20 % und eine all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung mit einer Quantenausbeute von 6 % aus. 74 % der anfangs angeregten Spezies gehen wieder in die all-trans-Konfiguration über [Hamm1996]. Die gesamte Quantenausbeute von 26 % ist der von HR (ca. 34 %) sehr ähnlich [Oesterhelt1985]. PSBR ist in seiner Photoreaktion dem HR ähnlicher als bR. bR führt keine Verzweigungsreaktion im  $S_1$  durch, sondern es gibt nur einen Zustand im  $S_1$ , der innerhalb 500 fs zerfällt und von dem 64 % in die Produktentstehung und 36 % in den Ausgangszustand zurückgehen [Herbst2002/I]. Für HR ist der intramolekulare Platz zwischen den Helices B, C, F und G größer als beim bR. Zum einen wird dadurch erst der Transport von Chloridionen, die eine größere räumliche Ausdehnung als Wasserstoffionen haben, möglich [Váró2000]. Zum anderen könnte man sich jedoch auch vorstellen, dass sich durch dieses größere Platzangebot mehr Konfigurationsmöglichkeiten des Retinalchromophors im  $S_1$  ergeben. Er ist natürlich nicht frei, sondern unterliegt sterischen Einschränkungen. Durch das größere Raumangebot für den Retinalchromophor geht die Beweglichkeit dessen ein wenig in die Richtung des freien protonierten Schiffsbases Retinals PSBR. Auch beim PSBR läuft die Primärreaktion ganz gleich wie beim HR über zwei Zeitkonstanten ab: 2.3 ps und 8.1 ps [Hamm1997]. Den Unterschied der kleineren Effizienz der all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung beim PSBR im

Vergleich zu HR und bR erklärt sich aus der einzigartigen Chromophor/Opsin (umlagerndes Protein)-Wechselwirkung: Es gibt hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den drei Tryptophan-Residuen Trp<sub>86</sub>, Trp<sub>182</sub> und Trp<sub>189</sub> des Opsins und dem Retinalchromophor beim bR [Henderson1990][Mogi1989]. Das Zentrum des Chromophors liegt zwischen den Tryptophanen Trp<sub>86</sub> und Trp<sub>182</sub>, was zu einer Hemmung der Isomerisierung im Zentrum des Chromophors führt. Diese Tryptophane liegen auch im HR vor, daher ist die Isomerisierung auch beim HR regionalspezifisch. Die Fixierung des Chromophor-Zentrums begünstigt die Rotation um die C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung des Chromophors beim HR wie beim bR. Die Unterschiede in der Lebensdauer für den elektronisch angeregten Zustand beim HR und bR muss aus dem Unterschied der anderen Aminosäuren-Residuen, die den Chromophor an das Opsin binden, erklärt werden können: Beim bR ist Trp in engem Kontakt zum  $\beta$ -Iononring des Chromophors. Da das Trp durch ein kleineres Trp beim HR „ersetzt“ wird, ist der  $\beta$ -Iononring des HR flexibler, was zu einer schlechteren Energiespeicherung in der C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung führt. Somit ist die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Chromophors beim HR weniger effizient als beim bR [Kandori1993/II]. In Abb. 4.32 ist das Ergebnis der letzten Interpretationen unserer Messergebnisse für den Zerfall des S<sub>1</sub>-Zustandes dargestellt. Nach Photoanregung erreicht das System den S<sub>1</sub> im Franck-Condon-Zustand (FC). Von dort aus verzweigt sich innerhalb ~ 300 fs die Reaktion in zwei Kanäle, einen reaktiven Pfad über die C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Isomerisierungscoordinate und einem nicht-reaktiven Pfad über eine allgemeine Coordinate hin zu zwei relaxierten Zuständen im S<sub>1</sub>: S<sub>1</sub><sup>loss</sup> und S<sub>1</sub><sup>iso</sup>.

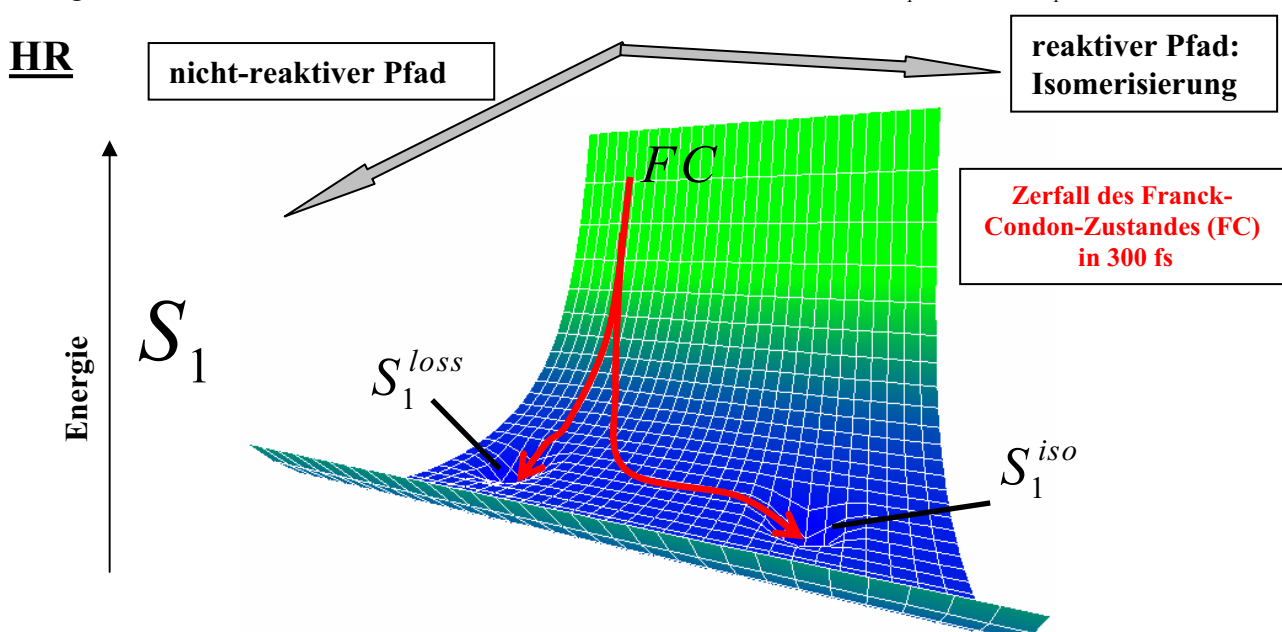
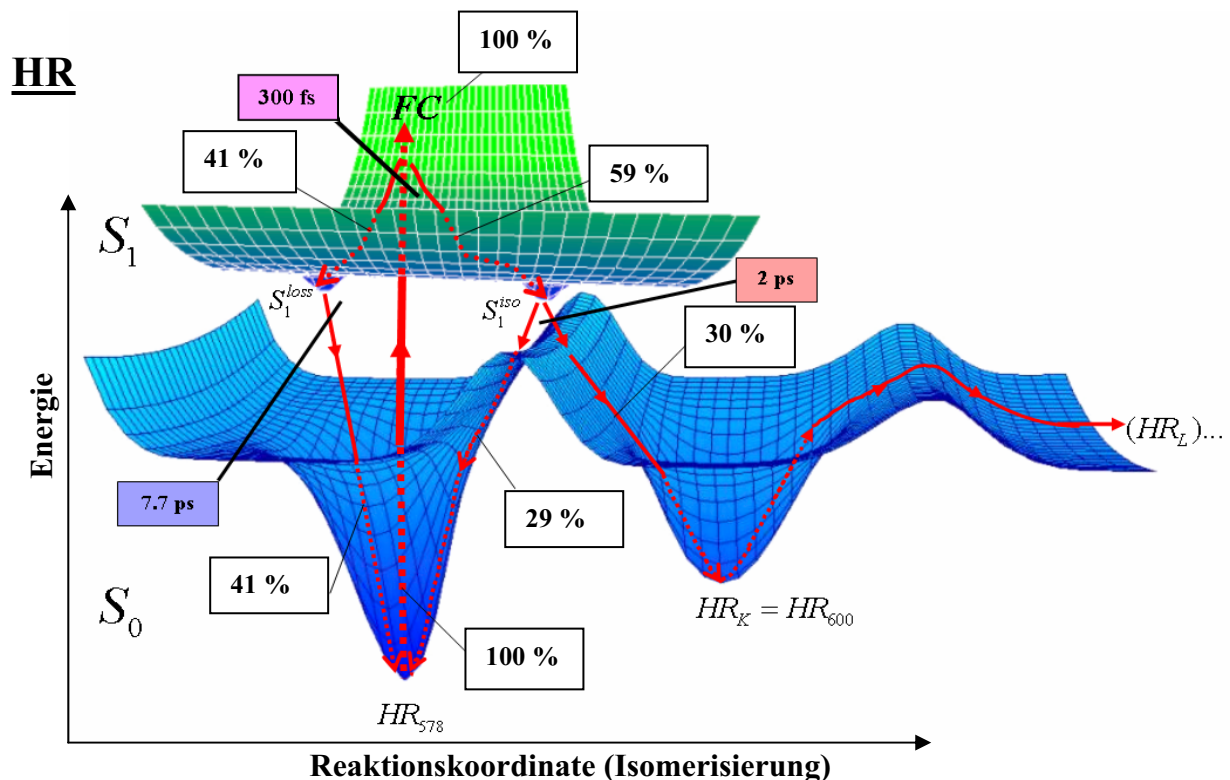


Abbildung 4.32: Ultrakurzzeitdynamik auf der S<sub>1</sub>-Oberfläche des HR.

**Wiederkehr des Ausgangszustandes  $HR_{578}$  und Entstehung des Photoproduktes  $HR_K$** 

Wir werden nun das Reaktionsschema nach und nach erweitern. Im Fingerprintbereich und im Ethylenbereich wurde deutlich, dass die Produktentstehung des  $HR_K$  nur mit der kurzen Zeitkonstante von 2.0(1) ps abläuft. Dass der reaktive Kanal der schnelle Kanal ist, kann durch eine Annäherung der  $S_1$ -Oberfläche an die  $S_0$ -Oberfläche im Bereich des lokalen Minimums des Zustandes  $S_1^{iso}$  erklärt werden [Arlt1995]. Der Rückgang des Ausgangszustandes  $HR_{578}$ , beobachtbar in der Dynamik der negativen Bleichsignale, erfolgte langsam mit 7.7(5) ps (Minima der GF-Amplitudenspektren der langsamen Zeitkomponente liegen bei den Bleichbanden), jedoch auch mit einem Anteil der schnellen Komponente (Verbreiterung der GF-Spektren für die schnelle Zeitkomponente in Richtung der Bleichbanden) (Abb. 4.15 und Abb. 4.21). Das Verhältnis der Amplituden für die 1.4 ps und die 6.8 ps –Komponente liegen bei unseren optischen Ultrakurzzeitmessungen bei ca. 0.7(2)<sup>1</sup>, d. h. von ursprünglich 100 % der angeregten Moleküle im Franck-Condon-Zustand gehen 59(6) % den reaktiven Pfad und 41(6) % den nicht-reaktiven Pfad entlang. Die Quantenausbeute für die Photoreaktion liegt bei ca. 30(2) %, was aus dem Rückgang der



**Abbildung 4.33:** Primärreaktion von HR: Potentialschema des  $S_1$  und des  $S_0$ .

<sup>1</sup> Siehe Tabelle 4.2 aus Kapitel 4.1.3.3:  $\lambda_{probe} = 490$  nm (Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes).



Bleichbanden ersichtlich ist (Ausnahme: Bleichbande bei  $1525\text{ cm}^{-1}$ )<sup>1</sup>. Abb. 4.33 zeigt die neuen Bedingungen der Photoreaktion. Auf bestimmten Reaktionswegen sind die Prozentpunkte von insgesamt 100 % ursprünglich angeregten Molekülen eingekästelt. Es gehen somit 41 % der Moleküle den nicht-reaktiven Pfad in Richtung  $S_1^{loss}$  und 59 % den reaktiven Pfad in Richtung  $S_1^{iso}$ . Die nicht-reaktiven Moleküle in  $S_1^{loss}$  zerfallen mit  $\sim 7.7\text{ ps}$  sofort wieder zum Ausgangszustand  $HR_{578}$ . Die reaktiven Moleküle in  $S_1^{iso}$  teilen sich ungefähr zur Hälfte auf: Die eine Hälfte geht in die Entstehung des Produktes  $HR_K$ , die andere Hälfte zerfällt wieder in den Ausgangszustand, jeweils mit einer Zeitkonstante von  $\sim 2\text{ ps}$ .  $S_1^{iso}$  zerfällt also mit  $2\text{ ps}$ . Da die Schwingungsabkühlung  $HR_J \rightarrow HR_K$  in unseren Messungen nie explizit beobachtet wurde, wird der Produktzustand  $HR_J$ , dessen Existenz in der Literatur kontrovers diskutiert wird [Polland1985][Kandori1991][Kandori1992][Arlt1995], hier weggelassen. Im Spektralbereich der C-C-Streckschwingungen („Fingerprintbereich“) befinden sich Markerbanden für ein Retinal, das in 13-cis-Konfiguration vorliegt [Braiman1982][Smith1987]. Die Entstehung der Produktbande um  $1195\text{ cm}^{-1}$  geschieht nur mit einer Zeitkonstante von ca.  $1.8\text{ ps}$  (Abb. 4.15). Es handelt sich hierbei um den kalten Produktzustand  $HR_K$ , da sich in den IR-Differenzspektren im Fingerprintbereich (Abb. 4.12) bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  auch zu sehr späten Zeiten diese Produktbande zeigt. Die Existenz des  $HR_J$ -Zustand konnte bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden.

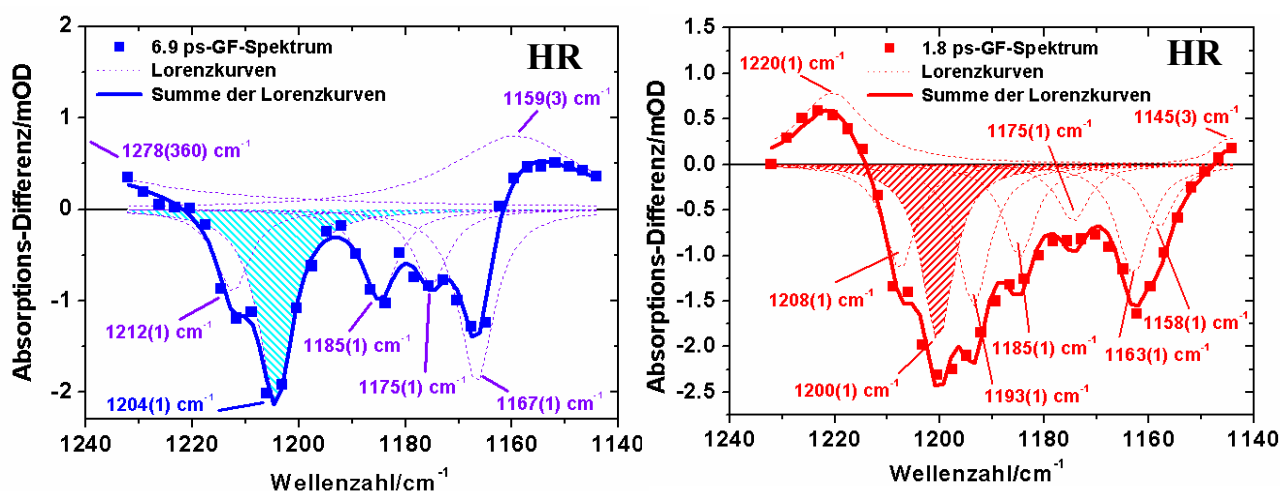
### **Beobachtbarkeit der Schwingungsabkühlung**

Die im letzten Kapitel besprochene Koinzidenz zwischen der langsamen Zeitkomponente für die Reaktion  $S_1^{loss} \xrightarrow{(7.7\text{ ps})^{-1}} S_0^{HOT}$  und der Zeit für die Schwingungsabkühlung  $\tau_{cool}$  des Ausgangszustandes, die wahrscheinlich in dem Fenster  $2.2\text{ ps} < \tau_{cool} < 7.7\text{ ps}$  liegt, führt zu einer beobachteten Zeitkonstante für die Abkühlung, die nahe der Formationsrate  $(7.7\text{ ps})^{-1}$  und nicht die wirkliche physikalische Rate  $(\tau_{cool})^{-1}$  ist. Die positiven Signale in den GF-Spektren für die langsame Zeitkomponente bei  $1162\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 4.15) und unterhalb von  $1512\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 4.21) sprächen für eine Schwingungs-

<sup>1</sup> Die Quantenausbeute aus dem Rückgang einer Bleichbande bestimmen zu können, setzt voraus, dass keine Produktbande der Bleichbande überlagert ist.

abkühlung eines heißen Eduktzustandes. Das Zeitverhalten im Fingerprintbereich läßt sich jedoch zumindest für das 6.9 ps-GF-Spektrum (Abb. 4.15) alternativ aus einer Überlagerung des langsamen Zerfalls einer  $S_1$ -Bande und dem Rückgang des Bleichsignals, der sowohl langsam als auch schnell geschieht, erklären: Bei einer bestimmten Wellenzahl hat die langsame Komponente des  $S_1$ -Zerfalls die langsame Komponente der Bleichbandendynamik komplett kompensiert (Abb. 4.17). Im 6.9 ps-GF-Spektrum ist das Signal bei  $1162\text{ cm}^{-1}$  fast Null. Auch im Ethylenbereich gibt es eine weitere, plausible Erklärung für das Auftauchen der positiven, langsamen Komponente im 8.5 ps-GF-Spektrum unterhalb von  $1512\text{ cm}^{-1}$  aus Abb. 4.21: Die Beobachtung des langsamen Zerfalls der nicht-reaktiven Moleküle in  $S_1^{loss}$  des elektronisch angeregten Zustandes. Das 0.11 ps-GF-Spektrum der ultraschnellen Komponente (Anhang/Ergänzungen zur Auswertung) könnte so verstanden werden, dass bei  $1504\text{ cm}^{-1}$  eine  $S_1$ -Bande entsteht, was der Reaktion  $FC \xrightarrow{(0.11\text{ps})^{-1}} S_1^{loss}$  entspricht.  $S_1^{loss}$  zerfällt innerhalb 7.7 ps nach  $HR_{578}$  (Reaktion:  $S_1^{loss} \xrightarrow{(7.7\text{ps})^{-1}} HR_{578}$ ).

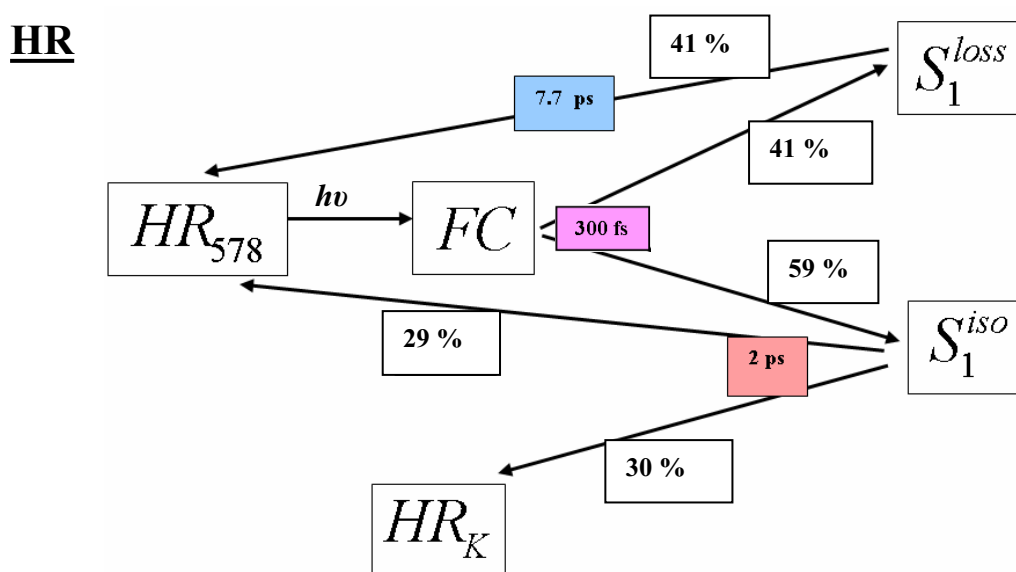
Wir konnten aufgrund der bisherigen Analyse unserer Messungen eine Primärreaktion gemäß Abb. 4.33 ableiten. Alternativ hierzu sollen durch eine Synthese der GF-Spektren im Fingerprintbereich (Abb. 4.15) die bisherigen Ergebnisse noch einmal verifiziert werden. Dazu fittet man die interpolierten (ein interpolierter Punkt zwischen zwei Punkten) GF-Spektren aus dem Fingerprintbereich mit mehreren Lorenzkurven an, um herauszufinden, wie groß die Anteile des Zerfalls und der Entstehung von Schwingungsbanden sind (vgl. Kapitel 4.1.2.3). Abb. 4.34 ist das Ergebnis dieser Fits. Nimmt man keine beobachtete Schwingungsabkühlung



**Abbildung 4.34:** HR: Synthese des 6.9 ps- (links) und 1.8 ps-GF-Spektrums (rechts) im Fingerprintbereich mit Lorenzkurven. Das 6.9 ps-GF-Spektrum zeigt im Produktbereich bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  keinen Beitrag zur Produktdynamik. Die 13-cis-Produktentstehung geschieht also nur mit der kurzen Zeit.

an, so müsste das Verhältnis der Flächeninhalte der angefitteten Lorenzkurven der GF-Spektren im Eduktbereich der langsamen und der schnellen Zeitkomponente in etwa dem Verhältnis der Prozentzahlen der Moleküle entsprechen, die gemäß den Teilreaktionen  $S_1^{loss} \xrightarrow{(7.7\text{ ps})^{-1}} HR_{578}$  und  $S_1^{iso} \xrightarrow{(2\text{ ps})^{-1}} HR_{578}$  den Grundzustand  $HR_{578}$  erreichen, also  $41(6)\%/29(6)\% = 1.4(4)$ . Die angefittete Lorenzkurve bei  $1204\text{ cm}^{-1}$  des 6.9 ps-GF-Spektrums hat einen Flächeninhalt von  $-24.4\text{ mOD}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Das Integral der Lorenzkurve des 1.8 ps-GF-Spektrums bei  $1200\text{ cm}^{-1}$  beträgt  $-20.8\text{ mOD}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Das Verhältnis ist  $24.4/(-20.8) = 1.2$ , was mit dem Wert 1.4(4), der sich aus Anzahl der Spezies aus den Teilreaktionen ergeben sollte, vergleichbar ist. Das hier vorgestellte Modell zur Primärreaktion ist somit vor dem Hintergrund der letzten Betrachtungen in sich schlüssig.

Das Potentialschema aus Abb. 4.33 zur Primärreaktion von HR wird nochmals in Abb. 4.35 als Reaktionsschema dargestellt.



**Abbildung 4.35:** Reaktionsschema zur Primärreaktion von HR. Die Prozentangaben beziehen sich auf 100 % aus dem Ausgangszustand angeregte Moleküle.

In der Synthese der GF-Spektren im Fingerprintbereich (Abb. 4.34) zeigen sich noch einige interessante Positionen für Banden, die entstehen bzw. zerfallen: Sowohl im GF-Spektrum der kurzen als auch der langen Zeitkomponente liegt bei  $1185\text{ cm}^{-1}$  eine negative Bande. Betrachten wir die IR-Differenzspektren im Fingerprintbereich in Abb. 4.12. Zu frühen Zeiten bei 190 fs zeigt sich im Differenzspektrum eine Eduktbande bei  $1186\text{ cm}^{-1}$  und zu späten Zeiten eine Produktbande in der Schulter bei  $1184\text{ cm}^{-1}$ . Die Dynamik der Produkt-

entstehung und des Bleichbandenrückgangs überlagert sich somit an dieser spektralen Position. Daher ist bei  $1185\text{ cm}^{-1}$  eine eindeutige Zuordnung der kurzen oder langen Zeitkomponente für die Produktentstehung bzw. für den Rückgang des Ausgangszustandes nicht zu treffen. Da jedoch bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  in den frühen Differenzspektren (Abb. 4.12) keine Eduktbande liegt, können wir bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  isoliert die (schnelle) Entstehung des  $HR_K$ -Produktes beobachten. In der Synthese der GF-Spektren in Abb. 4.34 gibt es neben der Bande bei  $\sim 1185\text{ cm}^{-1}$  noch eine Bande bei  $\sim 1212\text{ cm}^{-1}$ , welche sich auch in Resonanz-Raman-Messungen an HR [Smith1984][Maeda1985][Fodor1987] bzw. an bR findet [Smith1987][Lohrmann1991]. Dieser Bande wird beim bR die  $C_8$ - $C_9$ -Streckschwingung des all-trans-Retinalchromophors zugeordnet. Weitere Banden finden sich bei ca.  $1158\text{ cm}^{-1}$  und  $1175\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 4.34). Hierzu ließ sich keine Zuordnung finden. Die Dynamik in der zuletzt genannten Bande wird durch die langsame und die schnelle Zeitkomponente bestimmt.

### **Vergleiche zwischen HR, bR und PSBR**

Es ist eine bemerkenswerte Tatsache, dass die beim HR gefundenen Zeitkonstanten auch bei der Photoreaktion des protonierten, freien Retinals in Lösung (PSBR) beobachtet wurden [Hamm1997]. Die Quantenausbeuten sind bei HR und PSBR (34 % bzw. 26 %) ebenfalls vergleichbar. Man kann die Frage nach der Rolle von strukturellen Details an der höheren Quantenausbeute beim bR aufwerfen. Interessanterweise kommt es beim bR bei Substitution der geladenen Aminosäure Asparagin  $Asp_{85}$  in der Nähe des Retinalchromophors gegen ein neutrales Asparagin zu einer drastischen Verlangsamung der Photoreaktion. Die Reaktion läuft dann ebenfalls über zwei Zeitkonstanten, 2 ps und 10 ps, ab [Song1993]. bR läßt sich auch durch Substitution von  $Asp_{85}$  gegen ein neutrales Threonin, was in verschiedenen HR-Arten konserviert ist, in eine Chloridionenpumpe umwandeln. Man verwandelt also bR in eines dem HR ähnliches Protein [Sasaki1995]. Die Ladung von  $Asp_{85}$  ist daher zum Teil verantwortlich für die Unterschiede zwischen bR und HR, bzw. zwischen HR und PSBR und verändert graduell die Photoisomerisierungs-Reaktion [Hamm1996]. Da die Quantenausbeuten und die Reaktionskinetiken bei HR und PSBR so ähnlich sind, kann angenommen werden, dass der Einfluss des Apoproteins auf den Retinalchromophor beim HR relativ zu bR geringer sein wird.

### **Biologische Relevanz der Primärreaktion**

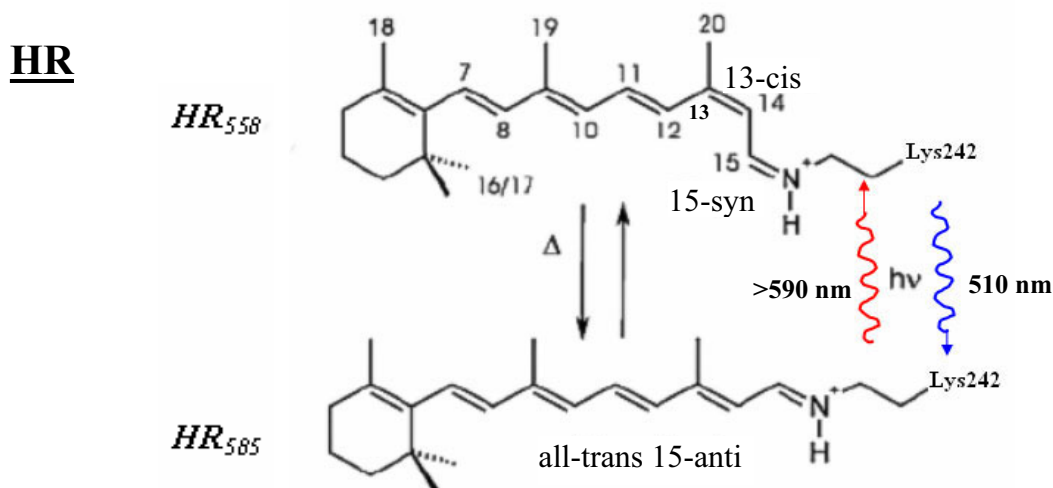
Bei Bakterien, die teilweise unter sehr widrigen Bedingungen ihr Dasein fristen, kommt es auf eine hohe, spezifische Wirksamkeit der Photoreaktion an. Diese Bakterien erhalten ihre Funktionen, wie z. B. Stoffwechsel, aufrecht, indem sie über die Zellmembran beständige Ionen-Gradienten bilden. Die Ionen werden dann über die Zellmembran gepumpt. Das Bakterium *Halobacterium Salinarum* macht dies u. a. über die lichtgetriebenen, retinalenthaltenden Proteine Halorhodopsin und Bakteriorhodopsin, die somit als Ionenpumpen fungieren. Die Isomerisierung des Retinalchromophors ist der erste wichtige Schritt in dieser Reaktionskette. Durch die Isomerisierung, bzw. die Drehung um die  $C_{13}=C_{14}$ -Doppelbindung, und die damit verbundene nachfolgende Konformationsänderung des umgebenden Apoproteins wird im Protein ein Kanal geöffnet, der das Zellinnere mit dem Zelläußeren verbindet. Über diesen Kanal können Ionen dann die Zellmembran passieren. Die Entstehung dieses Reaktionskanals sollte möglichst schnell geschehen, d. h. die Isomerisierung des Retinalchromophors muß sehr früh nach der Photoanregung einsetzen. In der Evolution des Bakteriums kam es zu einer schrittweisen Optimierung dieser Reaktion über eine sukzessive Veränderung der Potentialoberflächen. Man kann sich vorstellen, dass somit auch der Abstand zwischen der  $S_1$ - und der  $S_0$ -Oberfläche bei der reaktiven Spezies  $S_1^{iso}$  verkleinert wurde, damit die anschließende Isomerisierung möglichst schnell geschieht. Ein Teil von  $S_1^{iso}$  geht mit der kurzen Zeitkonstante direkt wieder in den Ausgangszustand über. Von dort aus kann wieder eine Photoreaktion an den schnell zurückgekehrten Spezies stattfinden, was die Effizienz weiter erhöht.

Zum ersten Mal wurde direkt durch die Untersuchung der zeitlichen Entwicklung von IR-Produkt- und Eduktbanden mittels transientser IR-Schwingungsspektroskopie nachgewiesen, dass die Produktentstehung zum  $HR_K = HR_{600}$  in der Primärreaktion von Halorhodopsin nach Photoanregung mit einer schnellen Zeitkonstante von  $\sim 2$  ps abläuft.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass man mit den zwei Zeitkonstanten 2 ps und 7.7 ps die Dynamik zweier verschiedener Spezies aus dem Ausgangszustand  $HR_{578}$  beobachtet. Der Ausgangszustand weist nämlich eine heterogene Zusammensetzung mit Spezies auf, deren Retinalchromophor in all-trans-Konfiguration bzw. in (13-cis, 15-syn)-Konfiguration vorliegt. Das nächste Kapitel 4.1.3 behandelt genau diese noch offene Frage.

### 4.1.3 Einfluss der (13-cis, 15-syn) Grundzustands-Spezies $HR_{558}$ („13-cis Zyklus“)

Halorhodopsin von *Halobacterium Salinarum* hat in Bezug auf die Konfiguration des Retinalchromophors einen heterogenen Ausgangszustand, der aus zwei Spezies besteht: Eine Spezies weist einen Retinalchromophor mit (all-trans, 15-anti)-Konfiguration ( $HR_{585}$ ) und die andere Spezies mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration ( $HR_{558}$ )<sup>1</sup> auf [Váró2000]. Selbst bei einer lichtadaptierten HR-Probe verschwindet der 13-cis-Anteil aus dem Grundzustand nicht vollständig [Váró1995/II]. Bei einer lichtadaptierten bR-Probe hingegen geht der Anteil der Spezies mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration ( $bR_{548}$ ) auf fast 0 % zurück [Konishi1976][Dencher1990]. Bei sHR liegt der Anteil der (13-cis, 15-syn)-Spezies selbst bei Lichtadaption mit weißem Licht noch bei ca. 17 % [Váró1995/II], bzw. bei 25 % [Zimányi1997]<sup>2</sup>. Legt man die sHR-Probe in Dunkelheit, so kommen die beiden Spezies innerhalb von ca. 10 h ins thermische Gleichgewicht [Hazemoto1984][Kamo1985]. Dabei liegen in dem dunkel-adaptierten sHR 52 % der Spezies aus dem Grundzustand in 13-cis-Konfiguration vor [Váró1995/II]. Der 13-cis-Anteil im Grundzustand bei Lichtadaption ist noch wellenlängenabhängig (Photochromie) [Lanyi1986][Lanyi1990][Zimányi1997][Lakatos2002]. Bei Lichtadaption der Probe mit blauem Licht (ca. 510 nm) liegt



**Abbildung 4.36:** Strukturformeln von  $HR_{558}$  und  $HR_{585}$  aus [Patzelt2002]. Die schwarzen Pfeile mit dem Dreieck symbolisieren das thermische Gleichgewicht im Dunkeln. Das Absorptionsmaximum von  $HR_{578}$  ergibt sich aus dem Konzentrationsverhältnis von  $HR_{585}$  und  $HR_{558}$ . Der rote, geschwungene Pfeil steht für Bestrahlung des HR mit rotem Licht, der blaue Pfeil bedeutet Bestrahlung mit blauem Licht (→ Photochromie des HR).

<sup>1</sup>Die Angabe des Absorptionsmaximums von 558 nm ist aus dem optischen Absorptionsspektrum der HR Probe berechnet [Zimányi1997][Váró1995/I] und wird mit einem relativ großen Fehler behaftet sein (vgl. Abb. 4.39).

<sup>2</sup>Der Anteil der (13-cis, 15-syn)-Spezies am Grundzustand des pHR beträgt immer ca. 14-16% [Zimányi1997].

der 13-cis-Anteil bei ca. 30 %, bei Bestrahlung mit rotem Licht ( $> 590$  nm) steigt der 13-cis-Anteil auf ungefähr 40 % [Zimányi1997]<sup>1</sup>. In Abb. 4.36 sind die Strukturformeln von  $HR_{585}$  (all-trans) und  $HR_{558}$  (13-cis) dargestellt.

Da also im Grundzustand immer neben der all-trans Spezies noch eine weitere Spezies existiert, die ihren eigenen Photozyklus durchläuft [Váró1995/I], muß diese Spezies auch in unseren IR-Daten berücksichtigt werden. Es liegen somit mit dem all-trans-Photozyklus zusammen zwei Photozyklen vor, die parallel ablaufen. Der Photozyklus der 13-cis-Spezies, der  $\sim 14$  ms dauert [Váró1995/I], weist nur zwei Intermediate auf, wobei das optische Absorptionsspektrum des ersten Intermediates nur leicht rotverschoben (573 nm) gegenüber dem Grundzustand  $HR_{558}$  ist und das zweite fast dasselbe Spektrum wie  $HR_{558}$  zeigt. Das erste Intermediat soll *CIS-1* genannt werden das zweite *CIS-2*. *CIS-1* ist spätestens 100 ns nach Photoanregung vorhanden. In [Váró1995/I] wird für den 13-cis-Photozyklus das folgende Reaktionsschema vorgeschlagen:  $HR_{558} \rightarrow CIS-1 \leftrightarrow CIS-2 \rightarrow HR_{558}$ . Bei diesem Schema kann nicht unterschieden werden zwischen zwei parallelen Photoreaktionen oder einer Photoreaktion mit einer Verzweigung, wobei der eine Photozyklus *CIS-1* und der andere *CIS-2* enthält. Eine Verzweigungsreaktion wurde für bR vorgeschlagen, um den Übergang des 13-cis-Photozyklus von bR zum all-trans-Zyklus zu beschreiben (Lichtadaption) [Gergely1994]. Der 13-cis-Photozyklus trägt weder bei bR noch bei HR zum Ionentransport bei [Lanyi1986]. Die Quanteneffizienz des 13-cis-Photozyklus ist nicht größer als beim all-trans-Zyklus [Dioumaev1997]. Für Halorhodopsin aus *Halobacterium Pharaonis* pHR ist der 13-cis-Photozyklus sogar weit weniger effizient als der all-trans-Zyklus. Fast nur die Spezies mit dem all-trans-Chromophor geht in den Photozyklus [Gerscher1997].

Das Absorptionsmaximum von  $HR_{585}$  korrespondiert mit einer Position für die Bande der Ethylenstretschwingung bei ca.  $1525\text{ cm}^{-1}$ . Bei der 13-cis-Spezies  $HR_{558}$  läge die C=C-Bande bei ca.  $1533\text{ cm}^{-1}$  [Aton1977]<sup>2</sup>. In RR-Messungen an pHR ist im Ethylenbereich eine Schulter bei ca.  $1538\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, die der 13-cis-Spezies aus dem Grundzustand zugeordnet wurde [Gerscher1997]. Auch in unseren Infrarotmessungen hat sich bereits der Einfluss

---

<sup>1</sup> Wie hoch der zu erwartende 13-cis-Anteil bei unseren Messungen sein wird, ist aus den Literaturangaben nur schwer ableitbar. Da die sHR-Probe in den VIS/IR-Experimenten hell-adaptiert ist, wird der 13-cis-Anteil wahrscheinlich deutlich unter 52 % ([Váró1995/I]) liegen. Da unsere Anregungswellenlänge von 570 nm zwischen den Werten der Wellenlängen mit den zugeordneten 13-cis-Konzentrationen [Zimányi1997] liegt, würde demnach bei unseren sHR-Proben ein 13-cis-Anteil zwischen 30 % und 40 % zu erwarten sein.

<sup>2</sup> In unseren 190 fs IR-Differenzspektrum sehen wir bei  $\sim 1540(1)\text{ cm}^{-1}$  eine schulterförmige Struktur (Abb. 4.37). Dieser Wert ist mit dem für sHR gemessenen Wert aus FT-Raman-Messungen von  $1534(4)\text{ cm}^{-1}$  verträglich [Zimányi1997]. Eine Zuordnung zu der 13-cis Spezies des Ausgangszustandes ist möglich.

der 13-cis-Spezies gezeigt, und zwar in den Differenzspektren zu frühen Zeiten im Ethylenbereich an der Schulter im Bleichsignal bei ca. 1538 cm<sup>-1</sup> (Abb. 4.20). In den folgenden Kapiteln wird der Einfluss der (13-cis, 15-syn)-Spezies HR<sub>558</sub> auf unsere Messungen abgeschätzt. Es wird vorab das 190 fs-IR-Differenzspektrum aus Abb. 4.20 mit mehreren Lorentzkurven angefitet, um einen ersten Eindruck über den Einfluss der 13-cis-Spezies zu bekommen. Die Anregungswellenlänge bei diesem Experiment lag bei ca. 570 nm, also ungefähr zwischen den Absorptionsmaxima der all-trans und der 13-cis-Spezies. Abb. 4.37/links zeigt das Ergebnis dieses Fits. Der Flächeninhalt der Bande bei 1540 cm<sup>-1</sup> ist -56 mOD·cm<sup>-1</sup>, der Flächeninhalt der Bande bei 1523 cm<sup>-1</sup> beträgt 129 mOD·cm<sup>-1</sup>. Setzt man vergleichbare Extinktionskoeffizienten für die all-trans und die 13-cis-Spezies voraus, so errechnet sich hieraus ein Anteil der 13-cis-Spezies von ca. 30 %.

Die Breite der Lorentzkurve bei 1523 cm<sup>-1</sup> beträgt 15.8 cm<sup>-1</sup>. Nach Glg. (2.10) berechnet man aus dieser spektralen Breite eine T<sub>2</sub>-Zeit von ~ 670 fs. In Abb. 4.37/rechts ist der Verlauf des T<sub>2</sub>-Signales der Bleichbande bei 1526 cm<sup>-1</sup> zu negativen Zeiten gezeigt. Das T<sub>2</sub>-Signal zerfällt zu negativen Zeiten hin mit einer Zeitkonstante von 0.7(1) ps. Dieser Wert stimmt mit dem theoretisch berechneten von 670 fs innerhalb des Fehlers überein.

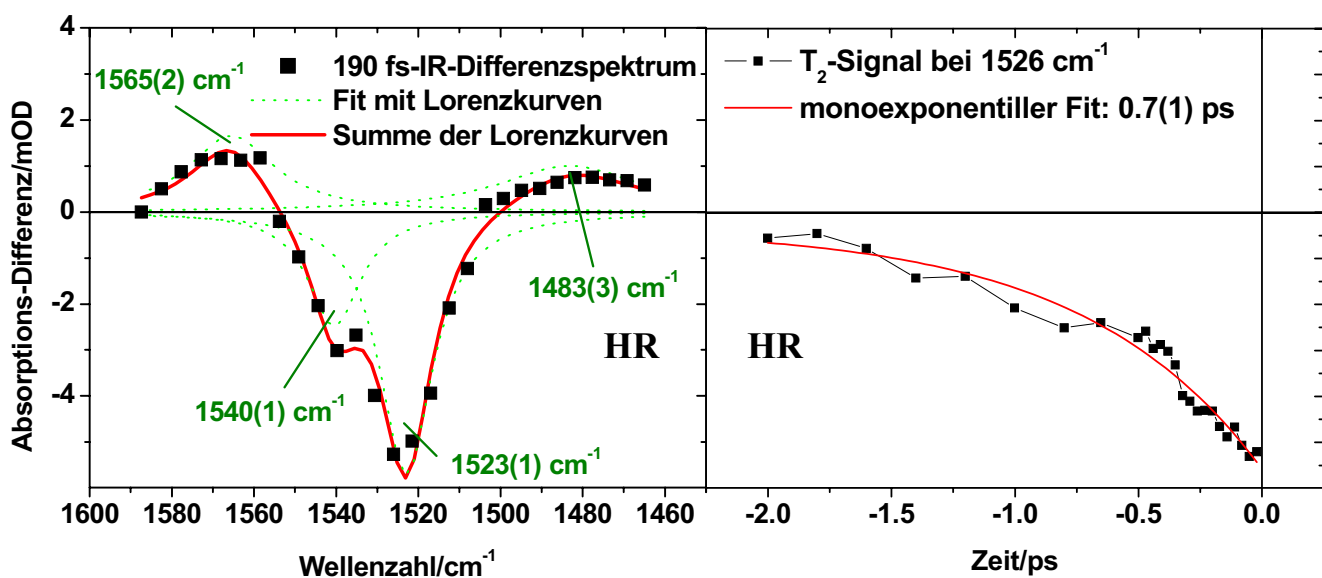
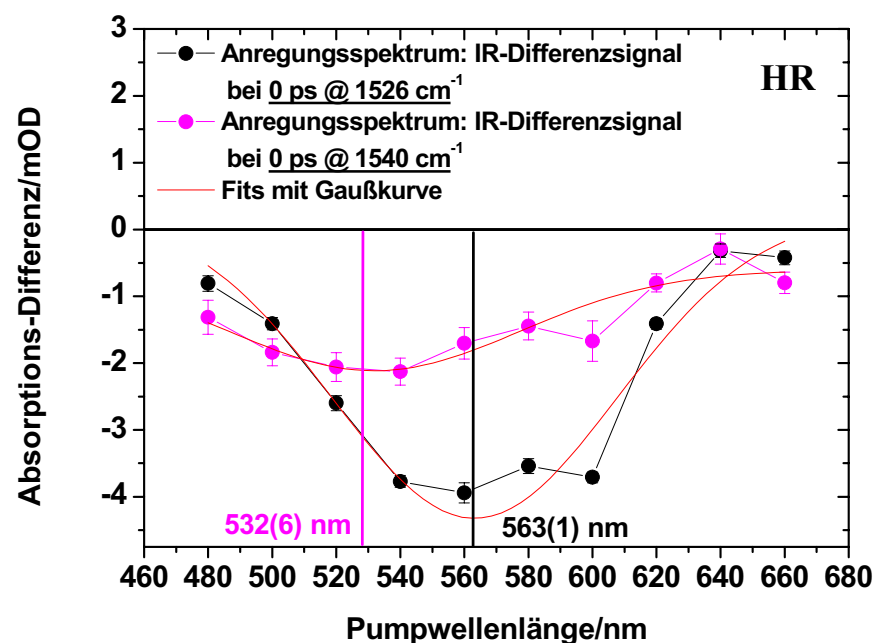


Abbildung 4.37: HR: Links: Synthese des 190 fs-IR-Differenzspektrums mit Lorentzkurven. Pumpwellenlänge: 570 nm. Rechts: Verlauf des T<sub>2</sub>-Signales zu negativen Zeiten bei 1526 cm<sup>-1</sup>.



#### 4.1.3.1 Anregungsspektren (VIS-IR) zwischen 480 nm und 660 nm

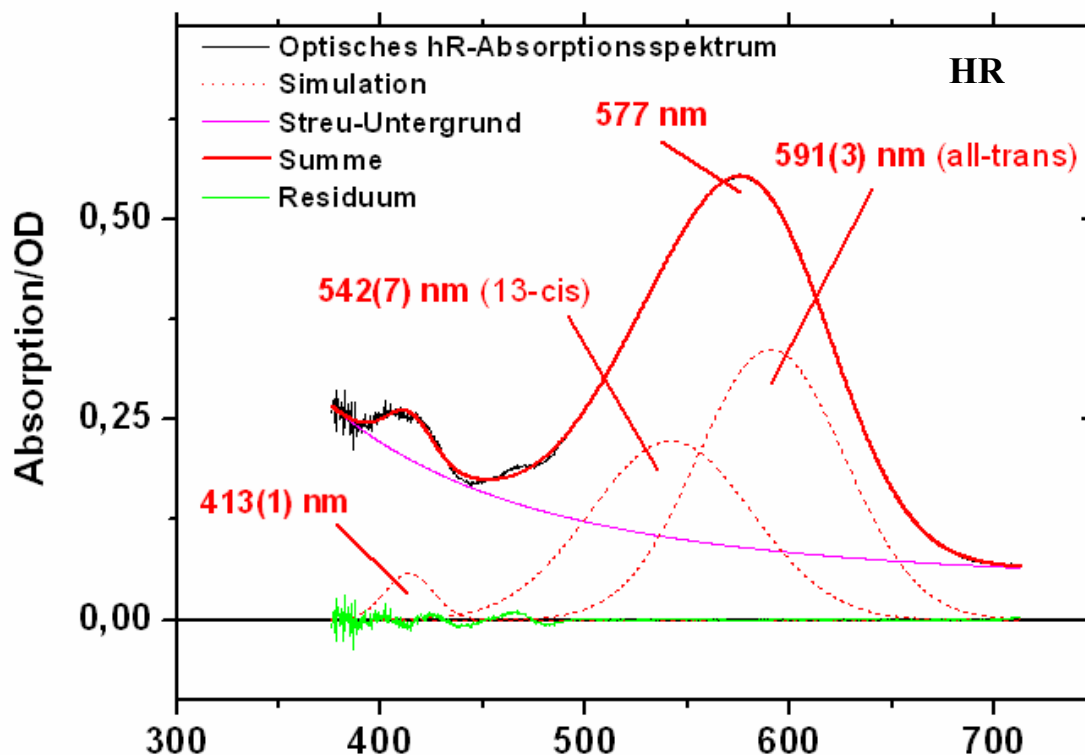
In diesem Kapitel soll der Einfluss der (13-cis, 15-syn)-Spezies auf unsere IR-Differenzsignale untersucht werden. Dazu wird die sHR-Probe mit verschiedenen Wellenlängen im Bereich 680 nm bis 480 nm angeregt. Da die (13-cis, 15-syn)-Spezies ein niedrigeres Absorptionsmaximum (558 nm) als die all-trans-Spezies (585 nm) hat (Abb. 4.39), so werden z. B. durch Anregung der Probe mit einem Puls, der weiter im blauen Wellenlängenbereich liegt, mehr 13-cis-Spezies und weniger all-trans-Spezies aus dem Ausgangszustand angeregt. Im IR-Differenzspektrum zeigen sich daher mehr Anteile der 13-cis-Spezies, und es lassen sich somit Zuordnungen für bestimmte Banden zur 13-cis- oder all-trans-Spezies finden. In Abb. 4.38 wurde die Signalgröße der Bleichbande zu 0 ps bei 1526 cm<sup>-1</sup> und der Schulter bei 1540 cm<sup>-1</sup> im Ethylenbereich in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge gemessen. Die Form der Anregungsspektren und deren Position ermöglichen eine Zuordnung zur 13-cis- bzw. all-trans-Spezies. Bei der Messung wurden die Anzahl der anregenden Photonen und die Pulslänge des Anregungspulses (70 fs) konstant gehalten. Die Systemantwort lag bei allen Anregungswellenlängen bei ca. 250 fs. Zu diesen Messungen muß gesagt werden, dass die Spottedurchmesser nicht genau bekannt sind. Die



**Abbildung 4.38:** HR: 0 ps-Anregungsspektren bei 1526 cm<sup>-1</sup> und 1540 cm<sup>-1</sup>. Die IR-Differenzsignale bei diesen Wellenzahlen und bei 0 ps werden in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge aufgenommen. Das Anregungsspektrum skaliert mit dem statischen, optischen Absorptionsspektrum der all-trans- bzw. 13-cis-Spezies (→Abb. 4.39), je nach Zugehörigkeit zu einer Spezies.

Anregungs-Effizienz verläuft jedoch proportional zur Intensität des Pumpulses. Da die Anregungswellenlänge geändert wurde, liegt kein konstanter Spottedurchmesser vor. Die Anregungsspektren haben daher mehr qualitative Aussagekraft!

Die Positionen des 1526 cm<sup>-1</sup>- und des 1540 cm<sup>-1</sup>-Anregungsspektrums liegen bei ~ 563(1) nm bzw. bei ~ 532(6) nm<sup>1</sup> (Abb. 4.38). Im Vergleich hierzu ist in Abb. 4.39 das optische Absorptionsspektrum der hell-adaptierten HR-Probe dargestellt. Das Absorptionsspektrum wurde mit drei Gaußkurven angefitet bei 413(1) nm (Cythochrom-Bande und β-Bande von HR), 542(7) nm (13-cis) und bei 591(3) nm (all-trans). Der Anteil der 13-cis-Spezies läge nach Abb. 4.39 bei ca. 42 %<sup>2</sup>, setzt man gleiche Extinktionskoeffizienten für beide Spezies voraus.



**Abbildung 4.39:** Absorptionsspektrum einer hell-adaptierten HR-Probe mit angefiteten Gaußkurven. Der Streu-Untergrund wurde abgezogen.

<sup>1</sup> Die Positionen der Anregungsspektren wurden durch einen Fit mit Gaußkurven gefunden.

<sup>2</sup> Der Fit aus Abb. 4.39 ist nur sehr langsam konvergiert. Das Ergebnis ist daher mit einem großen Fehler behaftet.

Die Position des 1540(1) cm<sup>-1</sup>-0 ps-Anregungsspektrums bei 532(6) nm ist gleich mit dem Maximum des optischen Absorptionsspektrums der 13-cis-Spezies (542(7) nm) aus Abb. 4.39. Die Schulter bei ~1540 cm<sup>-1</sup> skaliert also mit dem optischen Absorptionsspektrum der 13-cis-Spezies, was die Zuordnung zu dieser Spezies plausibel rechtfertigt <sup>1</sup>.

Die Skalierung des IR-Differenzsignales bei 1540 cm<sup>-1</sup> (Schulter) mit der 13-cis-Spezies soll in Abb. 4.40 anhand der 200 fs-IR-Differenzspektren bei den Anregungswellenlängen 500 nm, 520 nm und 620 nm gezeigt werden. Es ist zu erkennen, dass die Bande bei 1538(1) cm<sup>-1</sup> bei der blauen Anregungswellenlänge ausgeprägt ist, bei der roten und gelben Anregungswellenlänge ist sie kaum zu sehen. Diese Ergebnisse machen nochmals deutlich, dass die 13-cis-Spezies einen Einfluss auf unsere IR-Daten hat. Liegt die Anregungswellenlänge höherenergetisch, sind die beobachteten Anteile dieser Spezies in den IR-Differenzspektren ebenfalls größer, liegt sie niederenergetischer, so sehen wir fast nur die Banden der all-trans-Spezies.

Die Anregungswellenlänge der Messungen aus Kapitel 4.2.4 liegt bei 570 nm. Aus Abb. 4.37 ist ersichtlich, dass der 13-cis-Anteil in den IR-Daten recht klein, jedoch nicht vernachlässigbar ist. Eine Anregung der Probe bei einer Wellenlänge größer 600 nm bei allen Messungen aus Kapitel 4.2.4 ist nicht angemessen, da die IR-Differenzsignale dann sehr klein werden (siehe Abb. 4.38) und die Meßdauer sich damit überproportional verlängert hätte.

Anregungsspektren der HR-Probe wurden auch im Fingerprintbereich aufgenommen. Abb. 4.41 zeigt das Anregungsspektrum im Fingerprintbereich in der Bleichbande bei 1203 cm<sup>-1</sup> und bei 1186.5 cm<sup>-1</sup>. Die Bande bei 1186.5 cm<sup>-1</sup>, die nach [Zimányi1997] sowohl von der all-trans- als auch von der 13-cis-Spezies aus dem Grundzustand herrührt, hat ein 0 ps-Anregungsspektrum, dessen angefittete Position bei 560(4) nm liegt. Die Lage des 0 ps-Anregungsspektrums in der Bleichbande bei 1203 cm<sup>-1</sup> ist bei 563(6) nm. Diese beiden Werte sind als gleich anzusehen. Eine Zuordnung der Bande bei 1186.5 cm<sup>-1</sup> zur

---

<sup>1</sup>Wir dürfen hier allerdings nicht den oben angesprochenen Photochromismus außer Acht lassen. Bei einer roten Anregungswellenlänge verschiebt sich ja das Gleichgewicht etwas zugunsten von 13-cis, im blauen ist die Verschiebung gerade umgekehrt. Das bedeutet wiederum nicht, dass man durch die Verschiebung zugunsten einer Spezies diese Spezies nun in den Differenzspektren vorrangig sieht, da anteilig immer noch mehr von der Spezies angeregt wird, auf deren Frequenzseite man sich befindet.

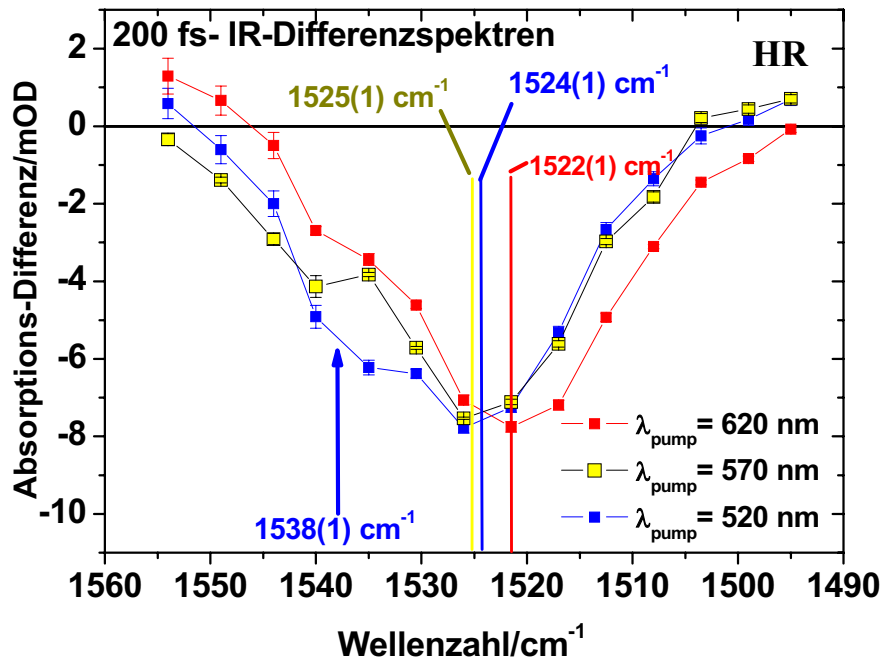


Abbildung 4.40: HR: 200 fs-IR-Differenzspektrum bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen (skaliert). Die Positionen der Banden wurden mit Gaußfits bestimmt.

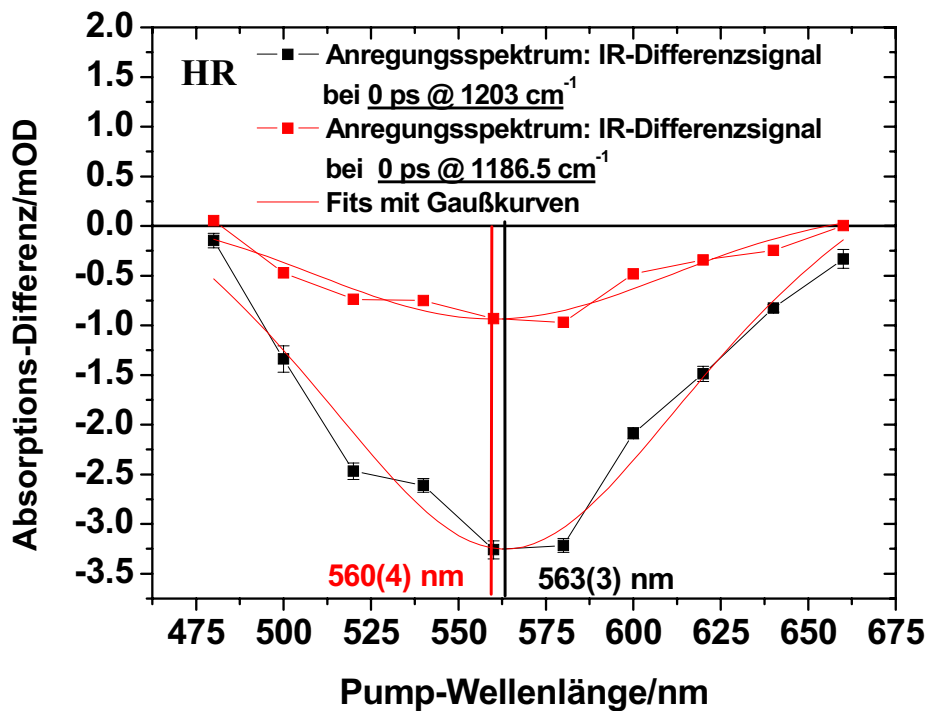


Abbildung 4.41: HR: 0 ps-IR-Anregungsspektrum im Fingerprintbereich bei 1203 cm<sup>-1</sup> und 1186.5 cm<sup>-1</sup>.

13-cis- bzw. all-trans-Spezies ist daher aus unseren Messungen nicht eindeutig zu treffen.

Um zu zeigen, dass die Produktbande bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  dem Produkt der all-trans-Spezies zuzuordnen ist, wurde ein 25 ps-Anregungsspektrum bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen (Abb. 4.42). Die angefittete Position des Anregungsspektrums ist bei  $573(6)\text{ nm}$ , was in der Nähe des Absorptionsmaximums der all-trans-Spezies liegt. Das 25 ps-Anregungsspektrum unterstreicht damit, dass die Produktbande bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  zum Produkt der all-trans-Spezies aus dem Ausgangszustand gehört.

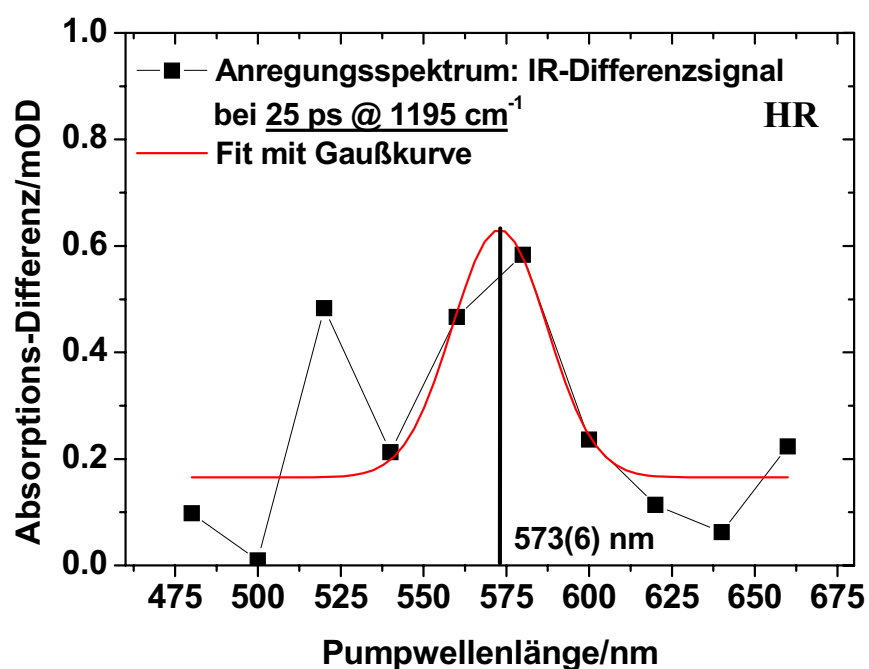


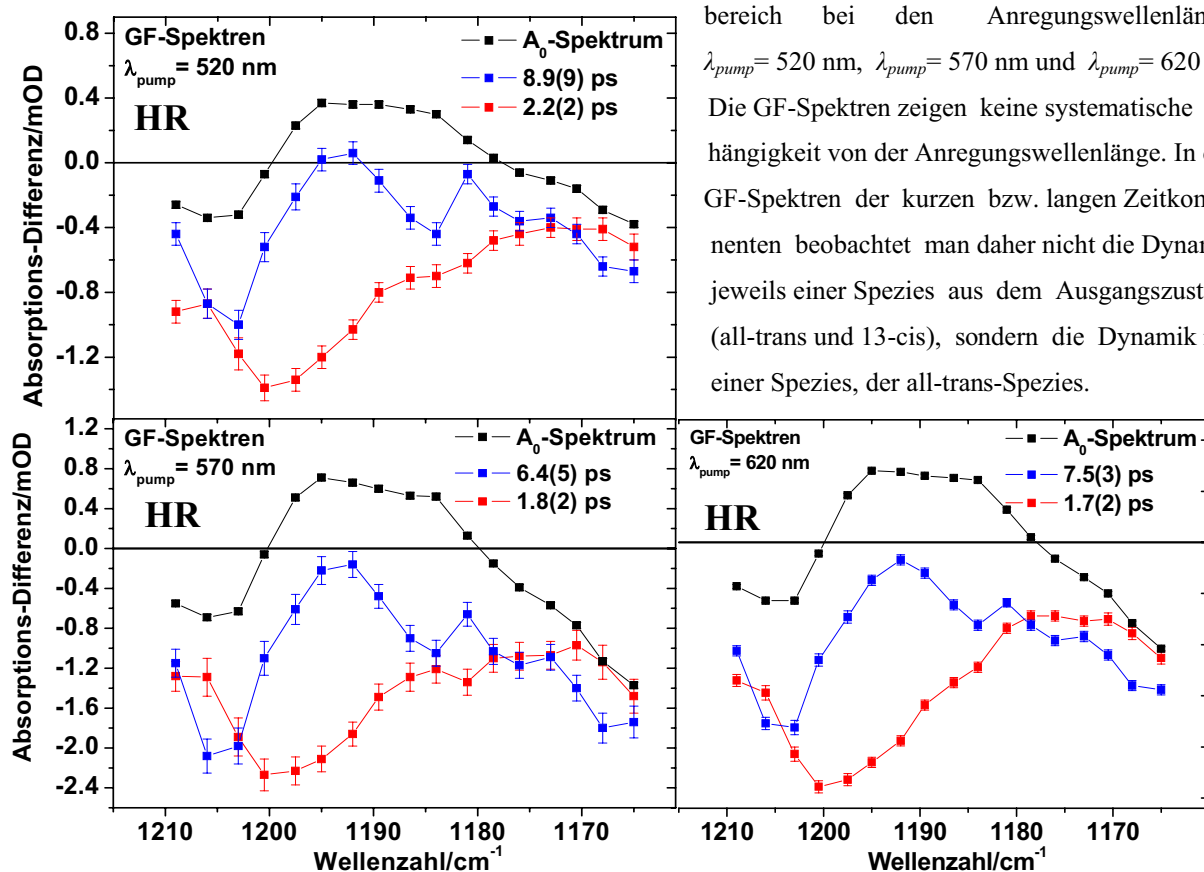
Abbildung 4.42: HR: 25 ps-IR-Anregungsspektrum im Fingerprintbereich bei  $1195\text{ cm}^{-1}$ .

Die Ergebnisse der Anregungsspektren im Ethylenbereich und im Fingerprintbereich zeigen, dass in unseren IR-Differenzsignalen auch Anteile der (13-cis, 15-syn)-Spezies aus dem Grundzustand liegen. Der Einfluss dieser Spezies auf unsere Messungen kann minimiert werden, indem man eine Anregungswellenlänge für den Pumpimpuls wählt, die niedrigerfrequent ist, denn dort regt man anteilig mehr die all-trans-Spezies als die 13-cis-Spezies an. In den IR-Differenzsignalen beobachtet man dann größtenteils die all-trans-Spezies bzw. deren Intermediate.

#### 4.1.3.2 Dynamik im Fingerprint- und Ethylenbereich bei verschiedenen Anregungswellenlängen

Da wir einen nicht-vernachlässigbaren Anteil der (13-cis, 15-syn)-Spezies aus dem Grundzustand von HR in den frühen IR-Differenzspektren beobachtet haben, stellt sich die Frage nach dem Einfluss dieser Spezies auf die Dynamik der IR-Differenzsignale. In diesem Kapitel wird daher untersucht, wie sich die Global-Fit-Spektren bei Variation der Anregungswellenlänge verändern.

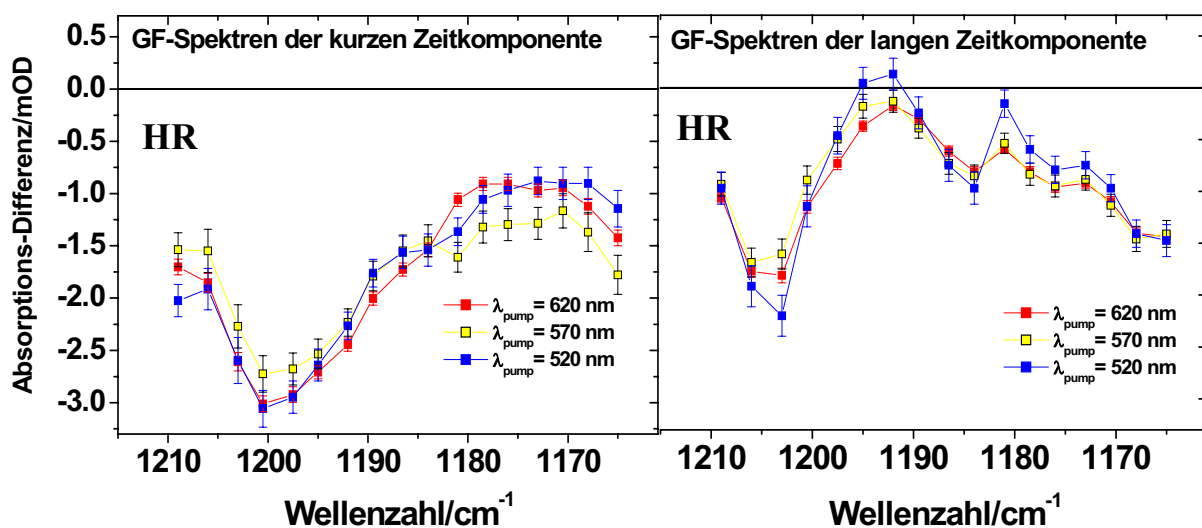
In Abb. 4.43 sehen wir das GF-Spektrum im Fingerprintbereich einer Probe, die mit Pumplicht der Wellenlängen  $\lambda_{pump} = 520$  nm,  $\lambda_{pump} = 570$  nm und  $\lambda_{pump} = 620$  nm angeregt wurde. Die spektrale Breite der Pulse lag bei jeweils ca. 23 nm.



**Abbildung 4.43:** HR: GF-Spektren im Fingerprintbereich bei den Anregungswellenlängen  $\lambda_{pump} = 520$  nm,  $\lambda_{pump} = 570$  nm und  $\lambda_{pump} = 620$  nm. Die GF-Spektren zeigen keine systematische Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. In den GF-Spektren der kurzen bzw. langen Zeitkomponenten beobachtet man daher nicht die Dynamik jeweils einer Spezies aus dem Ausgangszustand (all-trans und 13-cis), sondern die Dynamik nur einer Spezies, der all-trans-Spezies.

Da die Messungen an mehreren Tagen mit anderen Proben und unterschiedlichen Pumpleistungen durchgeführt wurden, kann man die GF-Spektren bei den verschiedenen Anregungswellenlängen nicht quantitativ miteinander vergleichen. Beim Vergleich geht es darum, auf Veränderungen im generellen Verlauf der GF-Spektren zu achten. Auf den ersten

Blick sehen die GF-Spektren in Abb. 4.43 sehr ähnlich aus. Die GF-Spektren für die kurze Zeitkonstante verlaufen gleich. Die kurze Zeitkonstante ist auch für die verschiedenen Anregungswellen innerhalb des Fehlers als gleich zu betrachten. Daher kann gesagt werden, dass das GF-Spektrum für diese Zeitkomponente keine Funktion der Anregungswellenlänge in dem verwendeten Bereich von  $\lambda_{pump}$  ist. Betrachten wir nun die GF-Spektren für die lange Zeitkomponente. Auch hier ist der Verlauf der GF-Spektren bei allen Anregungswellenlängen gleich. Die Größe der Zeitkonstanten ist bei allen drei Anregungswellen verträglich, und stimmen mit Ausnahme von 6.4(5) ps bei  $\lambda_{pump}=570$  nm fast sogar noch in ihren einfachen Fehlerintervallen überein. In Abb. 4.44 sind die einzelnen GF-Spektren aufeinander skaliert, um die Gleichheit im Verlauf nochmal zu unterstreichen. Für beide GF-Spektren gibt es keine ausgeprägte Wellenlängenabhängigkeit. Das bedeutet, dass wir in der

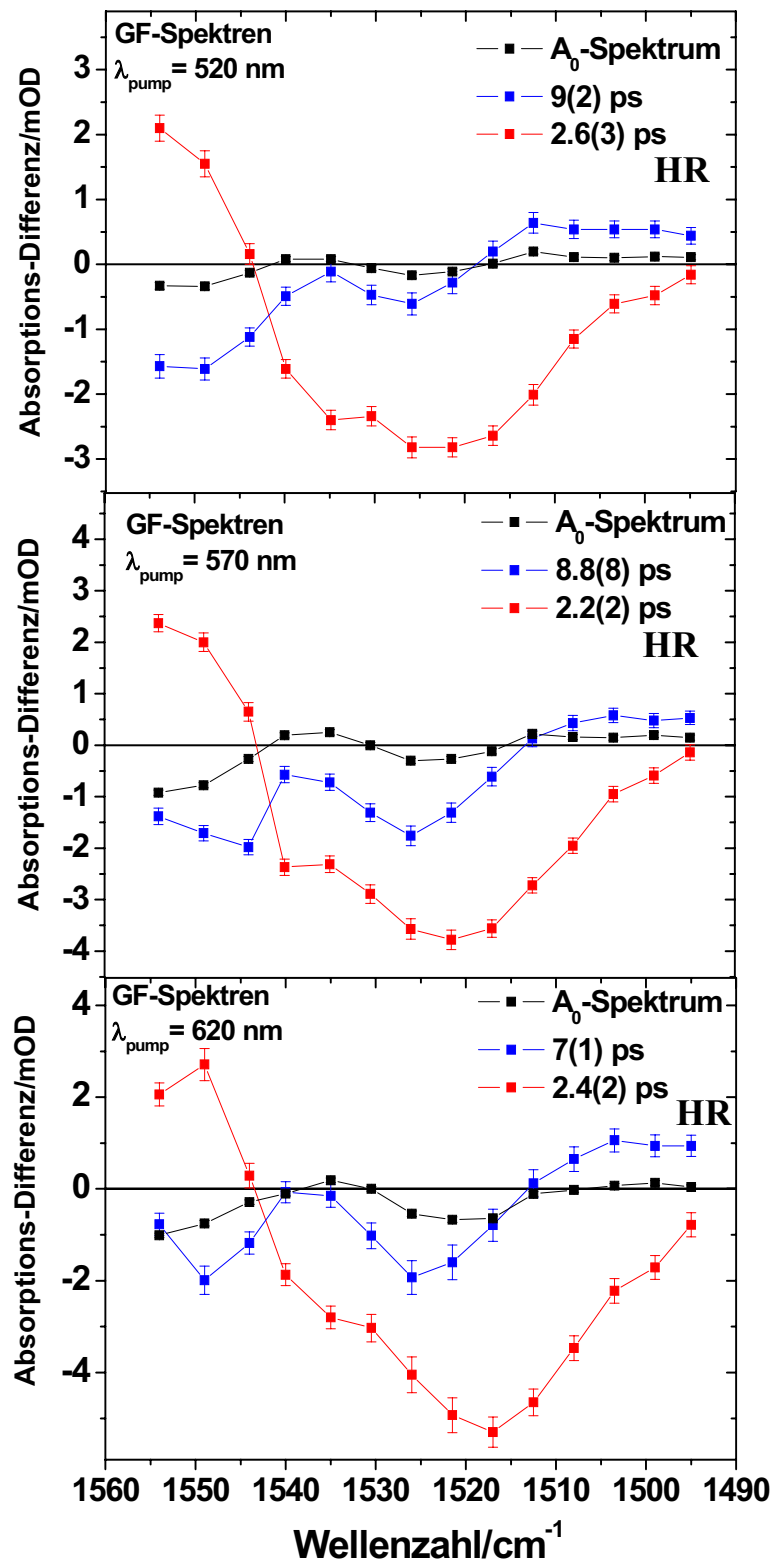


**Abbildung 4.44:** HR: GF-Spektren (skaliert) im Fingerprintbereich bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen.

Dynamik der IR-Differenzsignale im Fingerprintbereich vorrangig die Dynamik nur einer Spezies, der all-trans-Spezies sehen.

Kommen wir nun zu den GF-Spektren im Ethylenbereich bei verschiedenen Anregungswellenlängen. In Abb. 4.45 werden die GF-Spektren im Ethylenbereich bei den drei Anregungswellenlängen  $\lambda_{pump}=520$  nm,  $\lambda_{pump}=570$  nm und  $\lambda_{pump}=620$  nm

**Abbildung 4.45:** HR: GF-Spektren im Ethylenbereich bei den Anregungswellenlängen  $\lambda_{pump} = 520$  nm,  $\lambda_{pump} = 570$  nm und  $\lambda_{pump} = 620$  nm.





gezeigt. Die GF-Spektren der kurzen Zeitkomponente haben für alle drei Anregungswellen einen sehr ähnlichen Verlauf, und die Zeitkonstanten selbst sind innerhalb ihrer Fehler gleich. Es zeigen sich hier aber auch Unterschiede: Die Position des Minimums der GF-Spektren für die kurze Zeitkonstante verschiebt sich von 1523 cm<sup>-1</sup> bei  $\lambda_{pump}= 520$  nm auf 1521.6 cm<sup>-1</sup> bei  $\lambda_{pump}= 570$  nm bis schließlich auf 1518 cm<sup>-1</sup> bei  $\lambda_{pump}= 620$  nm. Der erste Produktzustand der (13-cis, 15-syn)-Spezies *CIS-I* hat ein optisches Absorptionsmaximum von ca. 573 nm [Váró1995/I]. Das korrespondiert mit einer C=C-Streckschwingung des Produktes der 13-cis-Spezies bei 1528.6 cm<sup>-1</sup>. Die Verschiebung des Schwerpunktes des GF-Spektrums der kurzen Zeitkomponente könnte mit einer schnellen Entstehung des Produktes der (13-cis, 15-syn)-Spezies erklärt werden. Die Form und Position der Schulter bei ca. 1538 cm<sup>-1</sup> im GF-Spektrum der kurzen Zeitkonstante bleibt für alle Anregungswellen gleich. Das bedeutet, dass die Schulter ausschließlich die Entstehung der Amid-II-K-Bande bei 1538 cm<sup>-1</sup> und nicht den Zerfall der (13-cis, 15-syn)-Spezies zeigt.

Beim Vergleich der GF-Spektren für die lange Zeitkonstante fällt die große Ähnlichkeit der Form der Spektren auf. Die langen Zeitkonstanten liegen innerhalb ihres zweifachen Fehlerintervalls und sind somit als verträglich zu betrachten. Bei  $\lambda_{pump}= 520$  nm ist das GF-Spektrum im Bereich der Rückgangs der Eduktbande um 1525 cm<sup>-1</sup> schwächer ausgeprägt. Im Amid-II-Bereich um 1552 cm<sup>-1</sup> hingegen scheint das GF-Spektrum von der Anregungswellenlänge unbeeinflusst. Die GF-Spektren für die schnelle bzw. für die langsame Komponente sollen noch in jeweils einer Grafik in Abb. 4.46 zusammengefasst werden. Die Ergebnisse im Ethylenbereich zeigen eine etwas stärkere Wellenlängenabhängigkeit der GF-Spektren für die kurze und für die lange Zeitkonstante als die Messungen im Fingerprintbereich, was auf einen kleinen Einfluss der (13-cis, 15-syn)-Spezies auf die Dynamik der IR-Differenzsignale hinweist. Da jedoch bei einer Anregungswellenlänge von 620 nm die 13-cis-Spezies praktisch nicht mehr angeregt wird und die GF-Spektren bei  $\lambda_{pump}= 570$  nm mit den GF-Spektren bei  $\lambda_{pump}= 620$  nm im Verlauf und in den gefundenen Zeitkonstanten nahezu gleich sind, kann davon ausgegangen werden, dass bei unserer üblichen Anregungswellenlänge von  $\lambda_{pump}= 570$  nm für die Experimente aus Kapitel 4.1.2.4 fast ausschließlich die Dynamik der all-trans-Spezies detektiert wird.

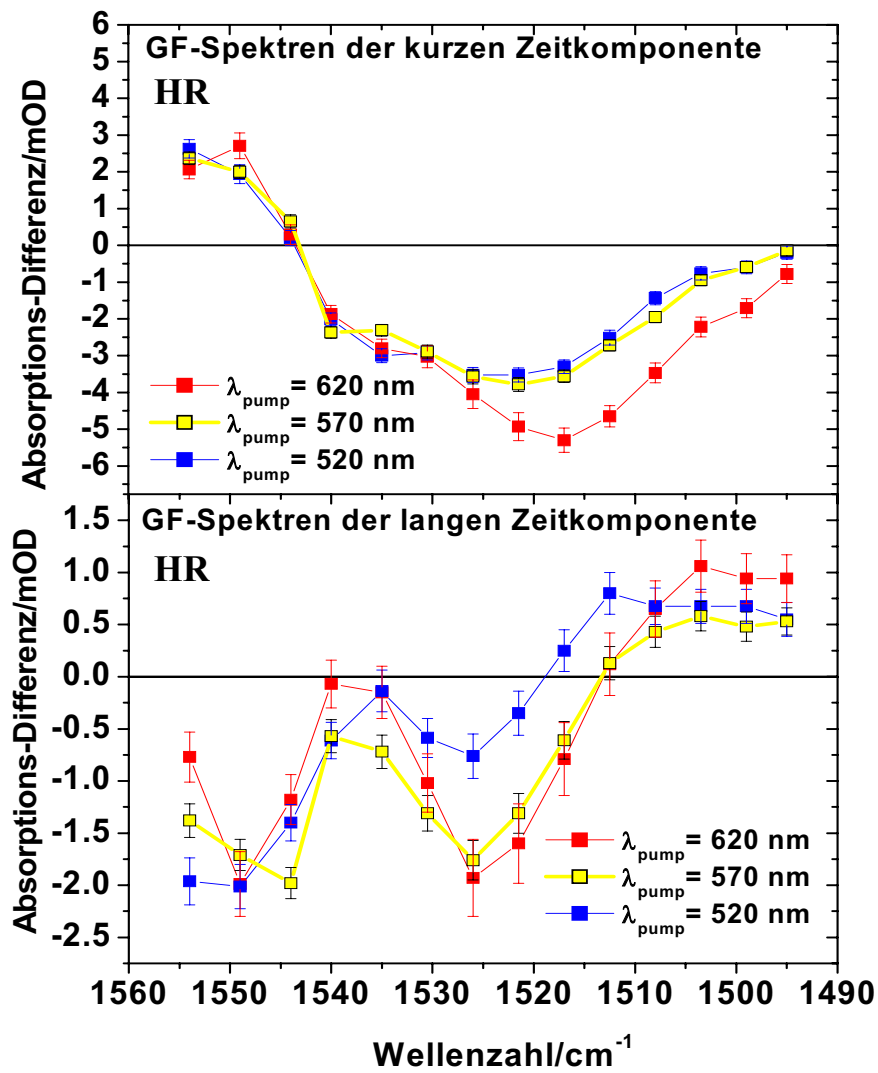


Abbildung 4.46: HR: GF-Spektren (skaliert) im Ethylenbereich bei verschiedenen Anregungswellenlängen.

#### 4.1.3.3 VIS-VIS-Messungen bei verschiedenen Anregungswellenlängen

Es wäre denkbar, dass die kurze ( $\sim 2$  ps) und die lange ( $\sim 7.7$  ps) Zeitkonstante von jeweils einer der beiden Spezies aus dem Ausgangszustand HR<sub>578</sub> mit all-trans- bzw. mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration des Retinalchromophors herrühren. Die GF-Spektren aus dem letzten Kapitel (4.1.3.2) widersprachen dieser Annahme, denn bei Variation der Anregungswellenlänge änderten sich diese kaum, unabhängig davon, ob niederenergetisch oder höherenergetisch, bzw. ob mehr von der (13-cis, 15-syn)- oder von der all-trans-Spezies angeregt wurde. Um nochmal den Einfluss der (13-cis, 15-syn)-Spezies durch ein Kontrollexperiment mit einer anderen Messmethode zu untersuchen, wurden Messungen mit optischer Kurzzeitspektroskopie mit verschiedenen Anregungswellenlängen an HR durchgeführt.

Die Anregungswellenlängen bei den Messungen mittels optischer Kurzzeitspektroskopie liegen bei  $\lambda_{\text{pump}} = 540$  nm,  $\lambda_{\text{pump}} = 570$  nm und  $\lambda_{\text{pump}} = 620$  nm. Die spektrale Breite der Pulse ist für die beiden zuletzt genannten Wellenlängen ca. 25 nm. Für  $\lambda_{\text{pump}} = 540$  nm ist die spektrale Breite 18 nm, so dass die Pulse spektral ausreichend separiert sind. Abb. 4.47 zeigt die Spektren der verschiedenen Anregungspulse und deren kleinen spektralen

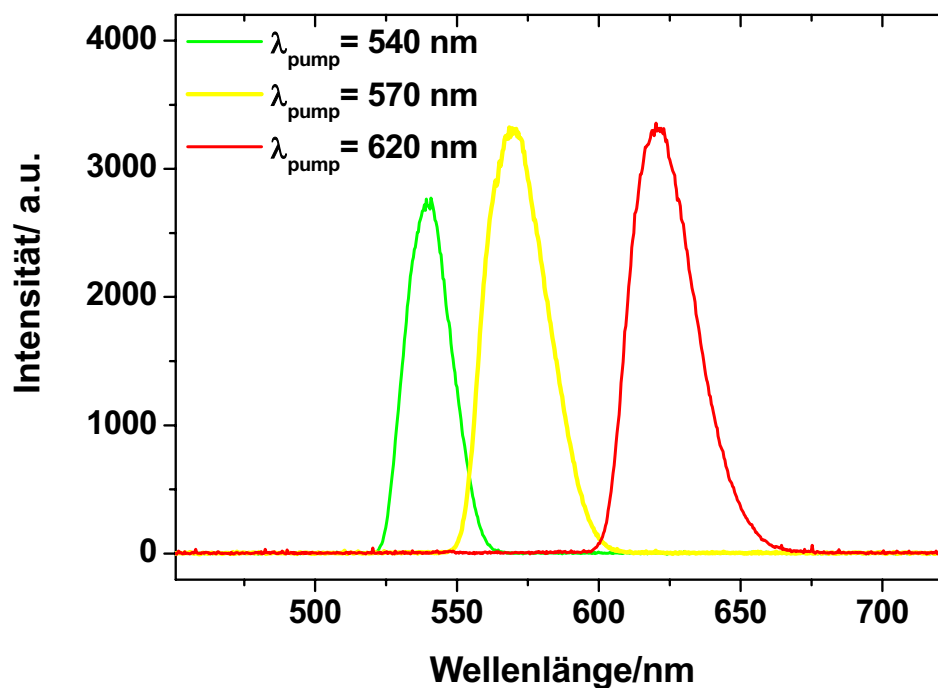
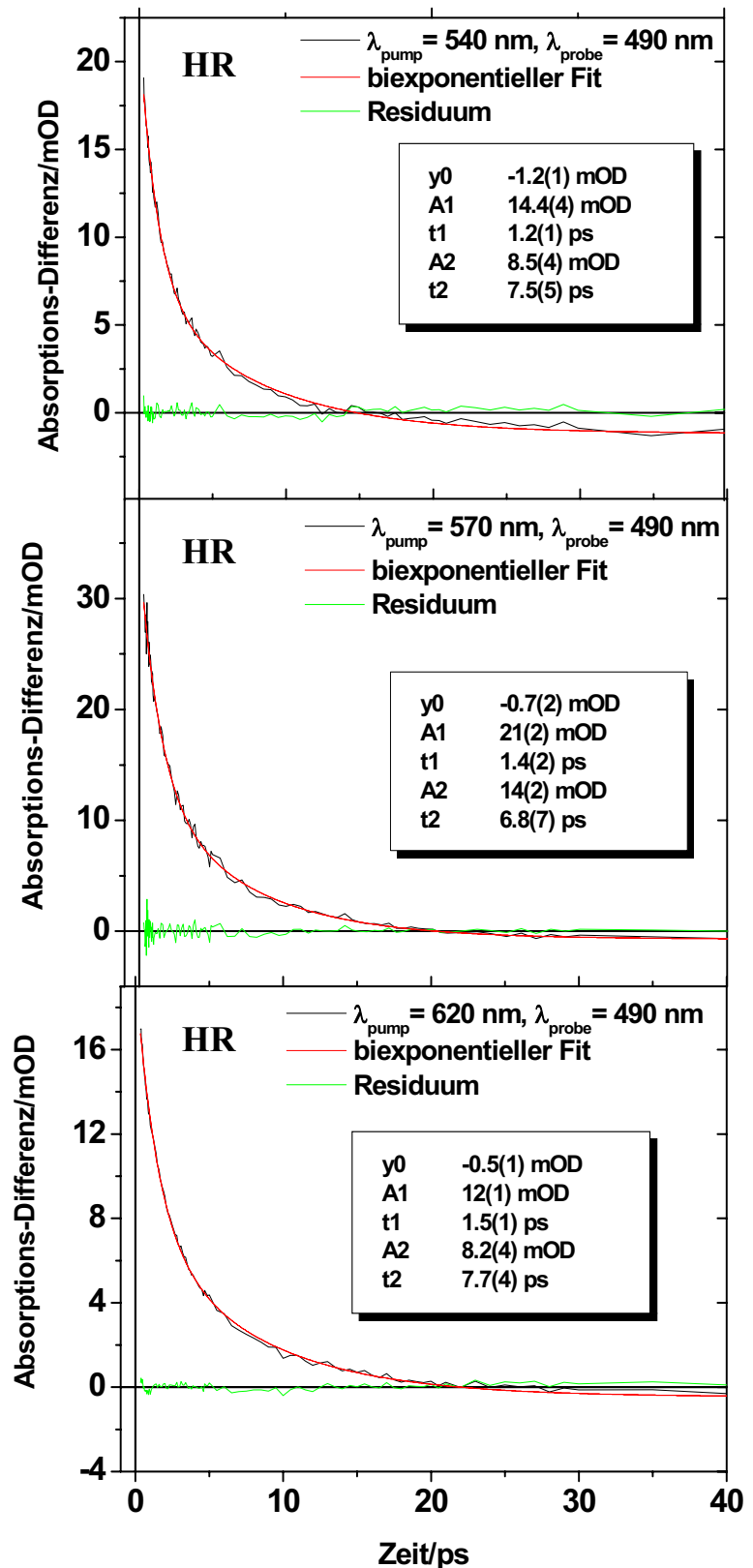


Abbildung 4.47: Spektren der drei verschiedenen optischen Anregungspulse.

Überlapp. Die Pulsenergie des Pumpulses liegt bei maximal 0.6µJ/Puls. Die Pulsenergie des Probepulses wurde auf den zehnten Teil der Pulsenergie des Pumpulses eingestellt. Die Systemantwort lag bei 50 fs.

Sollten die Zeitkonstanten aus beiden Spezies kommen, d. h. aus jeweils einer Spezies eine Zeitkonstante, so müssten sich die relativen Amplituden der einzelnen Zeitkonstanten für die

**Abbildung 4.48:** HR: Transienten bei den drei verschiedenen Pumpwellenlängen und der Probewellenlänge von  $\lambda_{probe} = 490$  nm. In den schattierten Kästen steht jeweils das Ergebnis des Fits.



Transienten je nach Anregungswellenlänge ändern. Abb. 4.48 stellt die Transienten bei den drei verschiedenen Pumpwellenlängen und der Probewellenlänge von  $\lambda_{probe} = 490$  nm dar. Abb. 4.49 zeigt die Transienten bei einer Probewellenlänge von  $\lambda_{probe} = 570$  nm bei Variation der Pumpwellenlänge.

**Abbildung 4.49:** HR: Transienten bei den drei verschiedenen Pumpwellenlängen und der Probewellenlänge von  $\lambda_{probe} = 570$  nm.

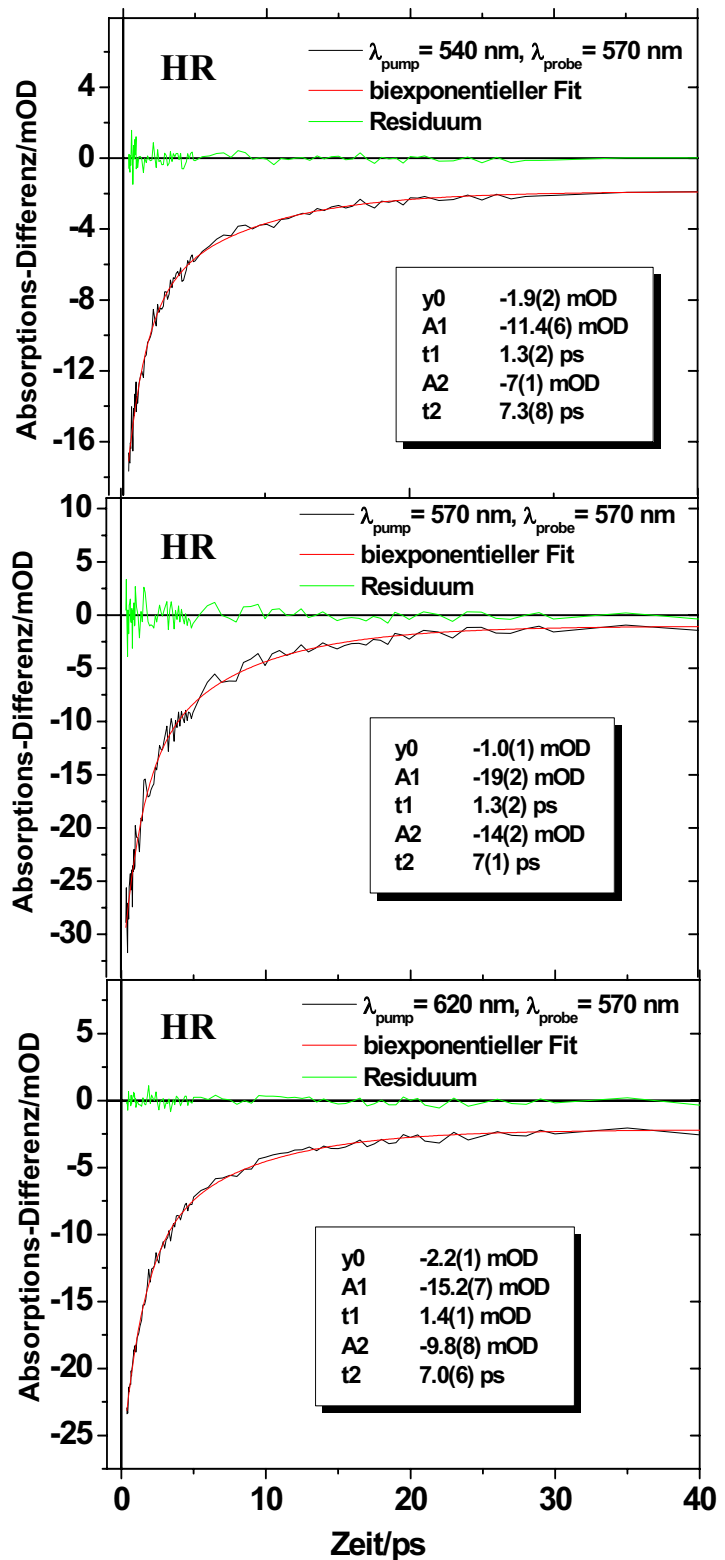


Tabelle 4.2 zeigt die Ergebnisse der biexponentiellen Fits aus den Abb. 4.48 und 4.49. Wie wir der Tabelle entnehmen können, ist das Verhältnis der Amplituden der langen und der kurzen Zeitkonstante  $A_1/A_2$  unabhängig von der Pumpwellenlänge. Das bestätigt die Ergebnisse der GF-Spektren aus dem letzten Kapitel und beweist, dass nicht jeweils einer Spezies aus dem Ausgangszustand eine Zeitkonstante zuzuordnen ist.

## HR

$\lambda_{probe} = 490 \text{ nm}$						$\lambda_{probe} = 570 \text{ nm}$				
$\lambda_{pump}/\text{nm}$	$t_1/\text{ps}$	$t_2/\text{ps}$	$A_1/\text{mOD}$	$A_2/\text{mOD}$	$A_1/A_2$	$t_1/\text{ps}$	$t_2/\text{ps}$	$A_1/\text{mOD}$	$A_2/\text{mOD}$	$A_1/A_2$
540	7.5(5)	1.2(1)	8.5(4)	14.4(4)	0.6(1)	7.3(8)	1.3(2)	-7(1)	-11.4(6)	0.6(1)
570	6.8(7)	1.4(2)	14(2)	21(2)	0.7(2)	7(1)	1.3(2)	-14(2)	-19(2)	0.7(1)
620	7.7(4)	1.5(1)	8.2(4)	12(1)	0.7(1)	7.0(6)	1.4(1)	-9.8(8)	-15.2(7)	0.6(1)

**Tabelle 4.2:** HR: Ergebnisse der biexponentiellen Fits für die Probewellenlängen  $\lambda_{probe} = 490 \text{ nm}$  und  $\lambda_{probe} = 570 \text{ nm}$  bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen.

Die Auswertung unserer Messungen mit verschiedenen Anregungswellenlängen sowohl mit optischer fs-Spektroskopie als auch mit transientser IR-Schwingungsspektroskopie zeigen, dass die beiden Zeitkonstanten 7.7 ps und 2 ps (Kapitel 4.1.2.4) nicht von zwei verschiedenen Spezies aus einer heterogenen Grundzustandsverteilung herrühren, sondern ausschließlich einer Spezies, der all-trans-Spezies zuzuordnen sind. Damit ist der molekulare Ursprung der zwei Zeitkonstanten 7.7 ps und 2 ps, die allein der Photoreaktion der all-trans-Spezies zuzuordnen sind, festgelegt worden. Mit der kurzen Zeitkonstante 2 ps ist die Photoproduktentstehung zum primären Photoprodukt  $HR_{600}$  und die Beobachtung des teilweisen Zerfalls der reaktiven Spezies in den Grundzustand verbunden. Mit der langen Zeitkonstante 7.7 ps zerfällt die nicht-reaktive  $S_1$ -Spezies zurück zum Ausgangszustand.

## 4.2 Bakteriorhodopsin

In diesem Kapitel werden Messungen am Retinalprotein Bakteriorhodopsin (bR) vorgestellt. bR ist ein Modellsystem für die Gruppe der Retinalproteine. Alle Retinalproteine besitzen den gleichen Retinalchromophor, eine gleiche Tertiärstruktur des Proteins (vgl. Abb. 1.10) und eine vergleichbare Photochemie (nach Photoanregung führt bR wie HR eine all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung des Retinalchromophors durch.). Die Primärreaktion von bR wurde eingehend mit transients IR-Schwingungsspektroskopie untersucht [Herbst2002/I]. Die Isomerisierung geschieht innerhalb von 500 fs, so dass der Retinalchromophor schon im J-Intermediat vollständig isomerisiert ist. Es gab jedoch noch einige offene Fragen, die in den folgenden Kapiteln behandelt werden.

### 4.2.1 Verdrillung des Retinalchromophors: „hydrogen-out-of-plane“-Schwingungen

„hydrogen-out-of-plane“-Schwingungen (HOOP-Schwingungen) sind Schwingungen des Retinalchromophors, bei denen Wasserstoffatome senkrecht zur Ebene der Polyenkette schwingen [Curry1985][Doig1991][Fahmy1991]. Wenn die Polyenkette verdreht ist, werden die IR-Differenzsignale groß: Die Infrarot-Übergangsmomente der HOOP-Schwingungen hängen empfindlich von der Verdrehung der Einfachbindungen ab. Die Verdrehung bewirkt eine Schwingungskopplung der HOOP-Moden mit Deformations-Moden der Polyenkette des Retinalchromophors. Somit werden die Dipole der HOOP-Schwingungen etwas in die Ebene der Polyen-Kette gedreht und verlieren dabei ihre senkrechte Orientierung [Fahmy1991]. Geht die Polyenkette in eine planarere Konfiguration über, werden die Signale wieder kleiner. Beim protonierten Schiff Base Retinal (PSBR) in Lösung beobachtet man daher kaum IR-Differenzsignale: PSBR liegt hierbei eher in einer planaren Konfiguration vor. Befindet sich der Chromophor in einem Protein, wie beim bR, so sind die Freiheitsgrade eingeschränkt. Der Chromophor kann hier keine planare Konfiguration einnehmen, da durch das umgebende Protein der Bewegungsfreiraum stark eingeschränkt ist. Im Grundzustand von bR, *bR<sub>570</sub>*, sind die HOOP-Amplituden in den IR-Differenzsignalen noch klein. Bei Isomerisierung des Retinalchromophors, die simultan zu dessen Verdrillung geschieht<sup>1</sup>, werden die HOOP-Signale stärker und spektral breiter. Wenn man also misst, wie schnell die HOOP-Banden entstehen, wird auch die Frage beantwortet werden, wann die Isomerisierung

<sup>1</sup>Die Verdrillung des Retinalchromophors wird durch die beiden Faktoren der räumlichen Einschränkung des Retinals und dessen Isomerisierung bestimmt. Der Retinalchromophor kann allerdings auch ohne Isomerisierung verdrillen.

eintritt. In RR-K-Tieftemperaturspektren [Braiman 1982] wird bei  $957\text{ cm}^{-1}$  die deutliche  $C_{15}$ -HOOP-Mode sichtbar. Im Bereich dieser HOOP-Bande haben wir Messungen mit transients IR-Schwingungsspektroskopie durchgeführt. Die Systemantwort lag bei ca. 400 fs. Die bR-Suspension wurde auf ein  $BaF_2$ -Fenster aufgetragen, da  $BaF_2$  im Wellenlängenbereich um  $960\text{ cm}^{-1}$  eine höhere Transmission als die üblichen  $CaF_2$ -Fenster hat. In Abb. 4.50 wird das IR-Differenzspektrum zu drei verschiedenen Zeiten gezeigt.

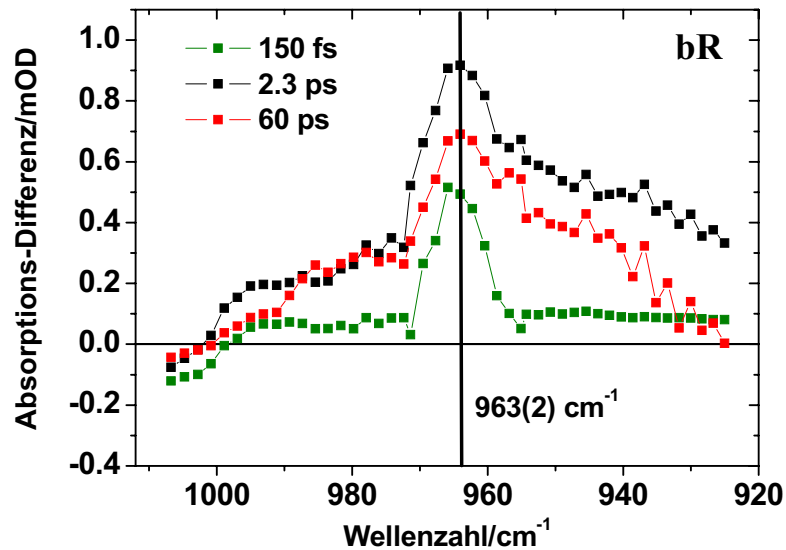


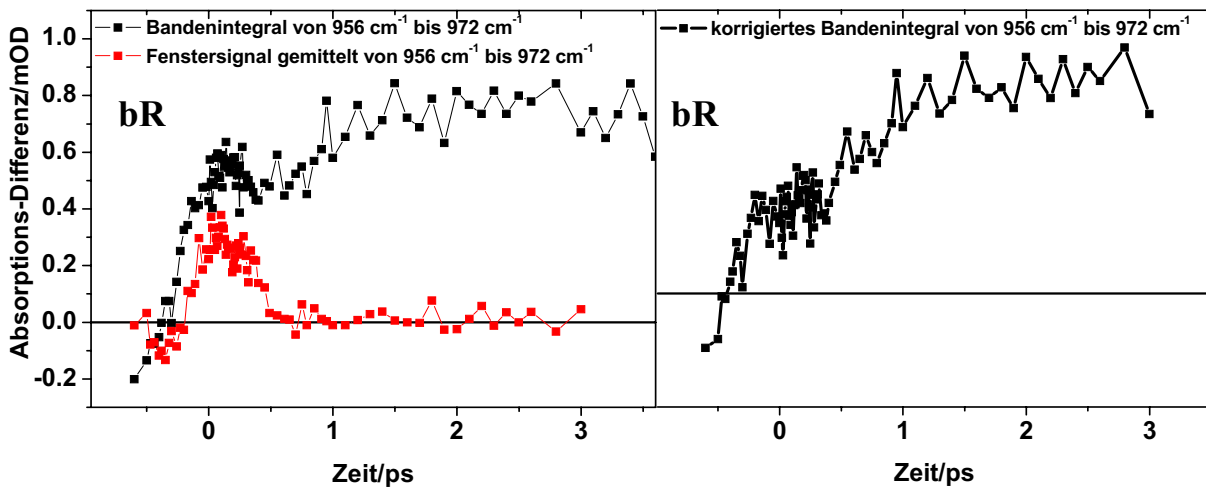
Abbildung 4.50: bR: Transiente IR-Spektren im HOOP-Bereich zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Photoanregung.

Aus Abb. 4.50 ist ersichtlich, dass zu 0.15 ps schon eine instantane Absorption vorliegt<sup>1</sup>. Das IR-Differenzsignal steigt bis ca. 2.8 ps an und fällt dann langsam wieder ab. Es entsteht dabei eine spektral breite HOOP-Bande, deren Position bei ca.  $963(2)\text{ cm}^{-1}$  liegt. Dieser Wert ist etwas größer als  $957\text{ cm}^{-1}$  [Braiman 1982], ist jedoch mit anderen gefundenen Positionen, wie etwa  $961\text{ cm}^{-1}$  [Smith1984] oder  $959(2)\text{ cm}^{-1}$  [Diller1987] vergleichbar. Für das K-Intermediat ( $bR_K$ ) wurde bei  $965\text{ cm}^{-1}$  bzw. bei  $966\text{ cm}^{-1}$  eine HOOP-Bande mit RR-Spektroskopie bei Zimmertemperatur gemessen [Althaus1995][Lohrmann1991]. Es wird nun die Dynamik der Entstehung und des Zerfalls der HOOP-Bande bei  $963\text{ cm}^{-1}$  untersucht. Da die IR-Absorptionsdifferenzen sehr klein sind, wird die Dynamik des Bandenintegrals von  $956\text{ cm}^{-1}$  bis  $972\text{ cm}^{-1}$  untersucht. In den Transienten zeigt sich zu frühen Zeiten innerhalb der Systemantwort ein „Fenstersignal“, dass sich aufgrund zu hoher Pumpleistung ergab. Die

<sup>1</sup>Da die HOOP-Bande bei  $963\text{ cm}^{-1}$  schon im 150 fs-Spektrum zu sehen ist, deutet auf einen gegenüber dem Ausgangszustand erhöhten Verdrillungsgrad im  $S_1$  hin. Der Verdrillungsgrad der Polyenkette würde sich erhöhen, bewegte sich das System im  $S_1$  entlang einer Torsionskoordinate (vgl. Kapitel 4.3.2, Abb. 4.72). Die Torsionsschwingungen würden die HOOP-Schwingungen somit beeinflussen.



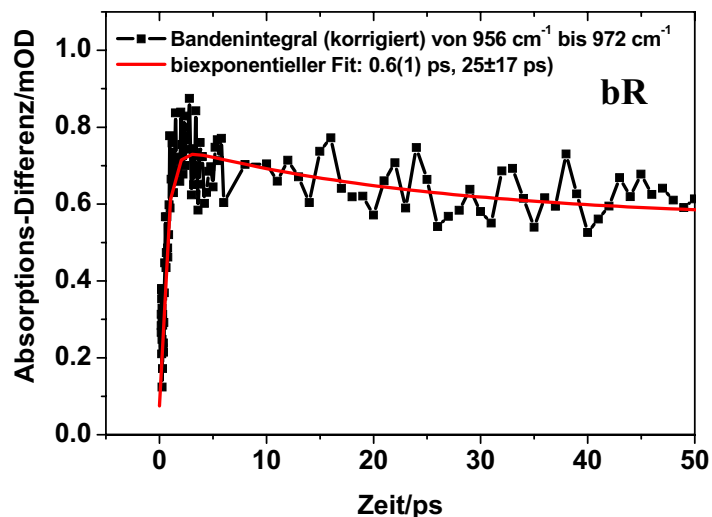
Messung wurde daher nochmal an einer BaF<sub>2</sub>-Leerprobe mit den gleichen experimentellen Parametern wiederholt. Dieses Signal wird dann von der eigentlichen Messung subtrahiert. In Abb. 4.51/links sind die Dynamik des Bandenintegrals zu frühen Zeiten und die des Fenstersignals dargestellt. In Abb. 4.51/rechts ist das Fenstersignal vom Bandenintegral abgezogen worden.



**Abbildung 4.51:** bR: Links: Dynamik des Bandenintegrals von  $956\text{ cm}^{-1}$  bis  $972\text{ cm}^{-1}$ . Das Fenstersignal ist zu frühen Zeiten sichtbar (vgl. Kapitel 2.2.4). Rechts: Das Fenstersignal wird von der eigentlichen Messung abgezogen.

Das korrigierte Signal aus Abb. 4.51/rechts wird über den gesamten Zeitbereich bis 60 ps mit einer biexponentiellen Funktion angefitet, wie in Abb. 4.52 gezeigt. Das Signal steigt

**Abbildung 4.52:** bR: Vom Fenstersignal bereinigte Dynamik des Bandenintegrals von  $956\text{ cm}^{-1}$  bis  $972\text{ cm}^{-1}$ .



mit  $0.6(1)\text{ ps}$  an und zerfällt dann mit einer großen Zeitkonstante von  $(25 \pm 17)\text{ ps}$ . Dass die HOOP-Bande mit  $0.6(1)\text{ ps}$  entsteht, zeigt in Übereinstimmung mit [Herbst2002/I] eine vollständige Isomerisierung des Retinalchromophors bereits im J-Zustand. Der J-Zustand ist ein heißer K-Zustand, der innerhalb von ca. 3 ps nach K abkühlt [Herbst2002/I]. Die hier

vorgestellten Messungen sprechen somit gegen die von Atkinson et al. [Atkinson2000] gemachte Annahme, dass das J-Intermediat von bR nicht in 13-cis-Konfiguration vorliegt und die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung erst beim J-K-Übergang stattfindet. Atkinson et. al. schlossen dies z. B. aus dem HOOP-Bandenmuster in CARS-Spektren. Dabei wurden die CARS-Spektren im HOOP-Bereich des J-Intermediates von einer bR-Wildtyp-Probe (natürliches bR) und einer bR-Probe mit geblocktem Retinal bR5.12, das keine Isomerisierung ausführen kann, verglichen.

Bereits beim J-K-Übergang wird die Verdrillung deutlich schwächer, was Resonanz-Raman Messungen im HOOP-Bereich des bR gezeigt haben [Doig1991]. Der langsame Zerfall des Signales aus Abb. 4.52 ist interessant: Er zeigt, dass der Grad der Verdrillung erst nach der Isomerisierung langsam wieder kleiner wird. Interessant ist, dass die Dynamik des bR im Amid-II-Bereich bei 1552 cm<sup>-1</sup> (Kapitel 4.3.3/Abb. 4.76/rechts) mit der Dynamik des HOOP-Signals vergleichbar ist. Die Bleichbande bei 1552 cm<sup>-1</sup> entsteht verzögert mit 0.5 ps bis 1 ps und zerfällt langsam mit 9(4) ps. Es scheint eine Korrelation zwischen der Protein- und der Verdrillungsdynamik zu bestehen, die vielleicht auf einem Einfluss der Verdrillung des Chromophors auf das Protein oder umgekehrt beruht.

#### 4.2.2 Mit D<sub>2</sub>O modifiziertes bR

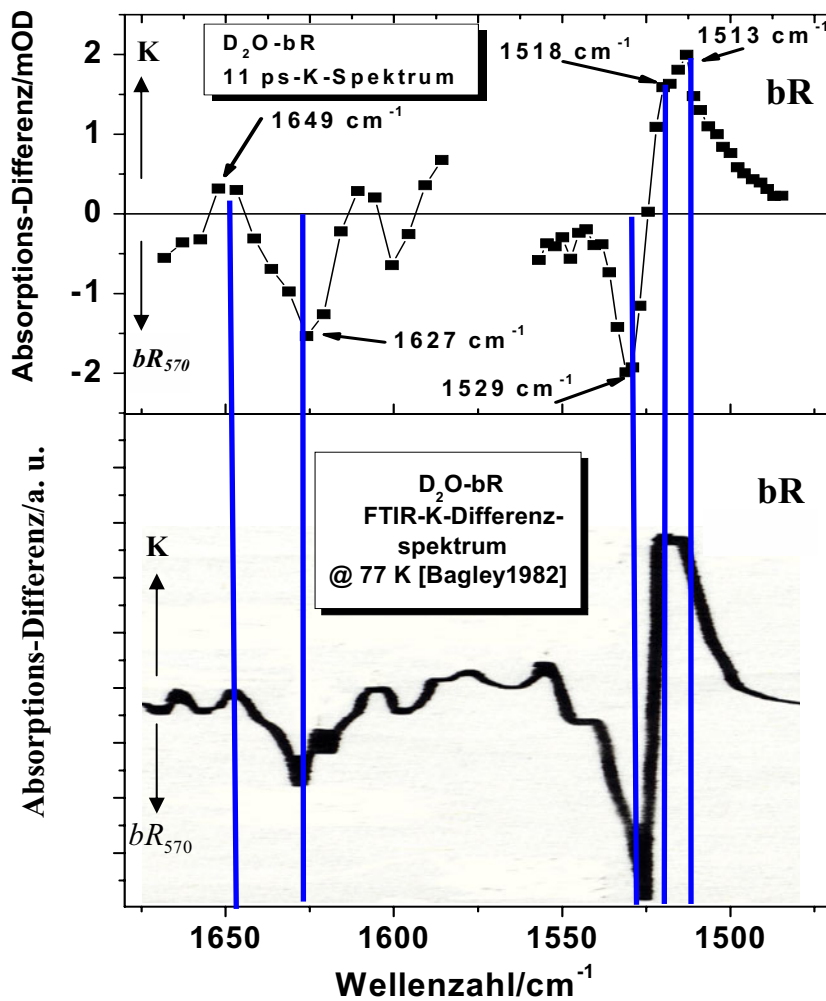
In bR laufen nach Photoanregung verschiedene Prozesse parallel ab, wie z. B. Isomerisierung des Retinalchromophors, Dynamik im elektronisch angeregten Zustand, Schwingungsrelaxation und die dynamische Wechselwirkung mit der Proteinumgebung. Ein möglicher Zugang zur Charakterisierung dieser Prozesse ist die Modifizierung des Systems durch Substitution des H<sub>2</sub>O in der bR-Probe durch D<sub>2</sub>O. Man muß die Messungen am D<sub>2</sub>O-bR mit denen am H<sub>2</sub>O-bR vergleichen in Hinblick auf Änderungen im Schwingungsspektrum und in der Dynamik. Aufgrund der Unterschiede können zusätzliche Informationen zu den oben beschriebenen Einzelprozessen erhalten werden <sup>1</sup>.

Vergleichen wir zunächst in Abb. 4.53 unser 11 ps-K-Spektrum mit dem statischen FTIR-K-Differenzspektrum in D<sub>2</sub>O [Bagley1982]. Beim Vergleich der Spektren fällt zuerst deren große Ähnlichkeit auf. Die C=ND-Bleichbande im Schiffische Base-Bereich liegt in beiden Spektren bei 1627 cm<sup>-1</sup>. Die Verschiebung der Position von 1640 cm<sup>-1</sup> beim

---

<sup>1</sup>Die spektralen Effekte lassen z. B. auf strukturelle Details, wie etwa den Protonierungszustand der Schiffischen Base schließen. Ausserdem kann man durch die Substitution u. a. etwas über die Kopplung zwischen verschiedenen Schwingungsmoden, wie etwa der C=NH-Streckschwingung mit der N-H-Biegeschwingung, lernen [Alshuth1985].

H<sub>2</sub>O-bR auf  $1627\text{ cm}^{-1}$  beim D<sub>2</sub>O-bR erklärt sich zum Teil aus der größeren Masse des Deuterons im Vergleich zum Proton. Da das Deuteron bzw. das Proton an der C=ND- bzw. C=NH-Streckschwingung des Retinalchromophors stark beteiligt ist, kommt es zu dieser Verschiebung. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Beweis für den Protonierungszustand der Schiffsbasis im K-Zustand des H<sub>2</sub>O-bR. Die C=C-Bleichbande liegt jeweils bei  $1529\text{ cm}^{-1}$ , und die Aufspaltung der K-Produktbande bei  $1513\text{ cm}^{-1}$  und  $1518\text{ cm}^{-1}$  deutet sich auch in unseren Messungen an. Das Deuteron spielt bei der Ethylenschwingung eine



**Abbildung 4.53:** D<sub>2</sub>O-bR: Vergleich unseres 11 ps-K-Spektrums bei Raumtemperatur mit dem 77 K-FTIR-K-Differenzspektrum [Bagley1982]. Man muss vor einem Vergleich der Spektren berücksichtigen, dass es durch die unterschiedlichen Temperaturen zu Veränderungen im Protein kommen kann.

kleinere Rolle: Die Position der Bleichbande bleibt unverändert. Die Aufspaltung der Produktbande spricht jedoch für einen verbleibenden Einfluss.

#### 4.2.2.1 Dynamik im Ethylenbereich

Kommen wir nun zu der Dynamik der Differenzsignale im Ethylenbereich von D<sub>2</sub>O-bR. Abb. 4.54/links enthält die IR-Differenzspektren zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei 1519 cm<sup>-1</sup> liegt zu späten Zeiten eine positive Produktbande. Aus Raman- und FTIR-Untersuchungen nimmt man an [Braiman1982], dass bei dieser Wellenzahl die Ethylenschwingung des K-Intermediats absorbiert. Zu früheren Zeiten unter einer Pikosekunde liegt eine gegenüber der K-Bande rotverschobene positive Absorptionsbande bei ca. 1511 cm<sup>-1</sup>. Diese Bande wird dem J-Zustand zugeordnet. Betrachten wir nun die Dynamik der Transiente bei 1520 cm<sup>-1</sup> in Abb. 4.54/rechts. Das Produkt entsteht wie beim H<sub>2</sub>O-bR mit 0.6(1) ps.

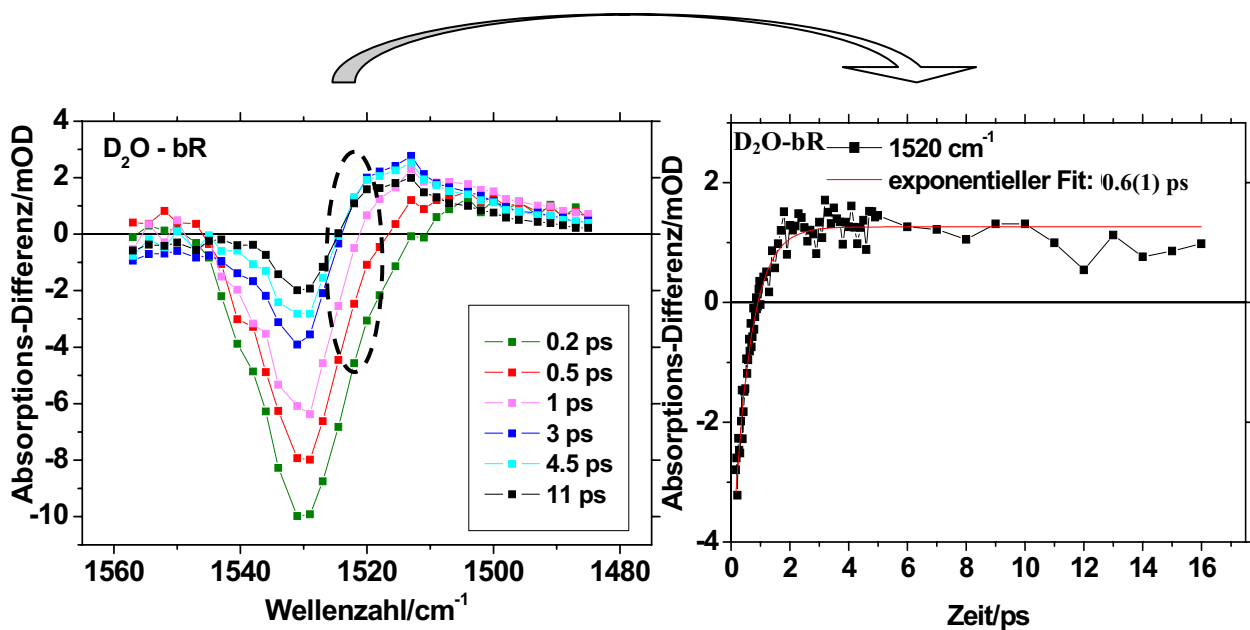
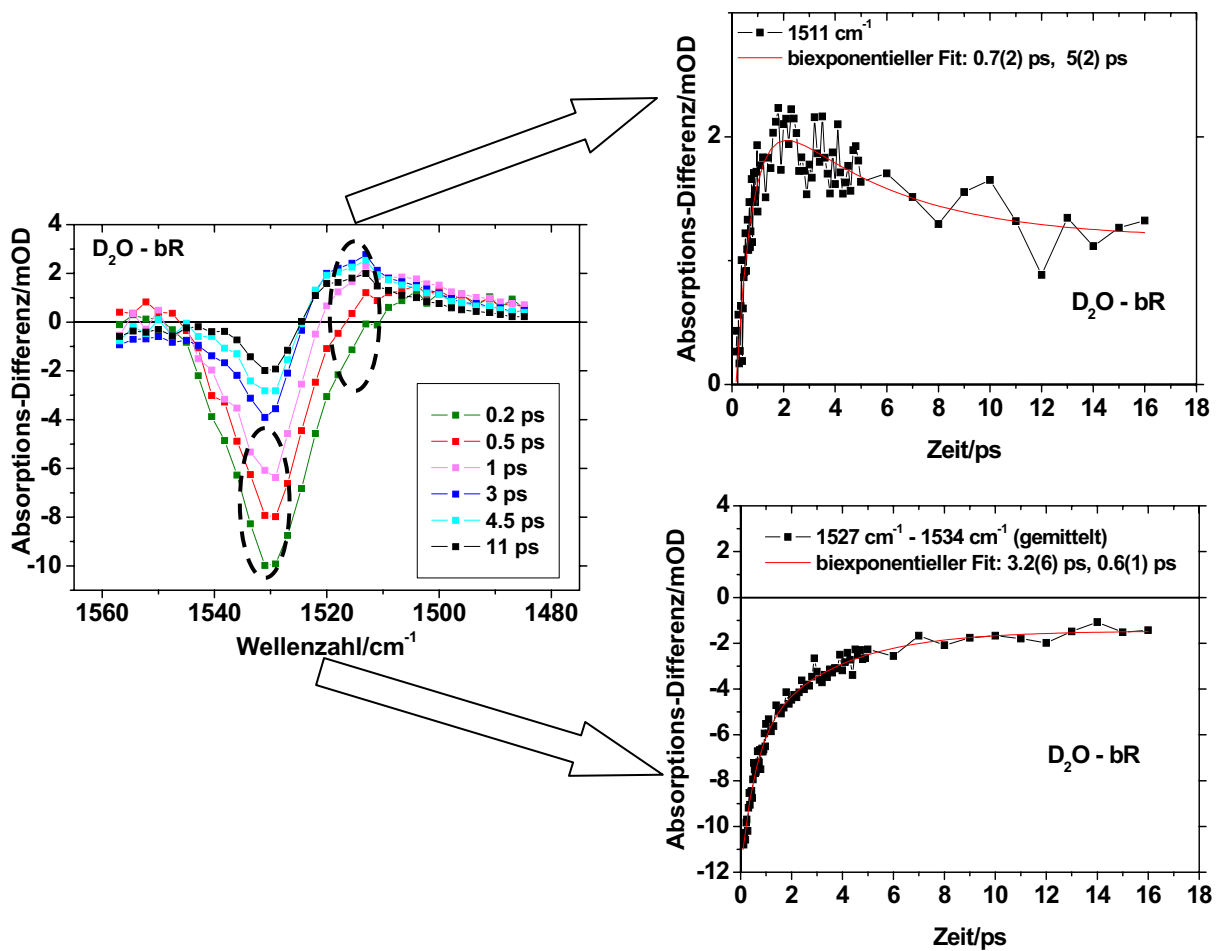


Abbildung 4.54: D<sub>2</sub>O-bR: Links: Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten im Ethylenbereich. Rechts: Dynamik bei 1520 cm<sup>-1</sup>.

In Abb. 4.55/rechts/oben ist die Dynamik bei 1511 cm<sup>-1</sup>, also an der Position der J-Absorptionsbande wiedergegeben. Die heiße J-Bande entsteht demnach mit 0.7(2) ps und zerfällt zum kalten K-Zustand innerhalb von 5(2) ps<sup>1</sup>. Schwingungsrelaxation auf der niederenergetischen Seite des Ethylenspektrums wird also auch in D<sub>2</sub>O-bR beobachtet. Die Zeitkonstante für die Schwingungsabkühlung beträgt also ca. 5(2) ps. Das ist mit dem für das H<sub>2</sub>O-bR gefundenen Wert von 3 ps [Herbst2002/I] innerhalb des Fehlers gleich.

<sup>1</sup> Die heißen all-trans-Grundzustandsbanden tragen auch zu der beobachteten Schwingungsabkühlung bei, eventuell sogar mehr als die heißen 13-cis (J)-Banden [Herbst2002/I].



**Abbildung 4.55:** D<sub>2</sub>O-bR: Links: Differenzspektren zu diversen Zeiten im Ethylenbereich. Rechts/oben: Dynamik bei 1511 cm<sup>-1</sup>. Rechts/unten: Dynamik in der Ethylenbleichbande zwischen 1527 cm<sup>-1</sup> und 1534 cm<sup>-1</sup>.

In Abb. 4.55/rechts/unten sind die gemittelten Transienten zwischen 1527 cm<sup>-1</sup> und 1534 cm<sup>-1</sup> dargestellt. Das Signal zerfällt mit den beiden Zeiten 3.2(6) und 0.6(1) ps. Der Rückgang der Ethylenbleichbande bei 1529 cm<sup>-1</sup> geschieht also auch beim D<sub>2</sub>O-bR über zwei Zeitkonstanten. Das biexponentielle Zeitverhalten im Rückgang der Bleichbande erklärt sich aus der spektralen Überlagerung mit der J-Entstehung auf der niederenergetischen Seite des Ethylenbereiches. Ein monoexponentieller Fit für den Rückgang des Bleichsignals (nicht gezeigt) findet eine Zeitkonstante von 1.4(1) ps. Der Rückgang der Bleichbande ist somit langsamer als die Produktentstehung.

### GF und SVD im Ethylenbereich der D<sub>2</sub>O-bR-Probe

Die Dynamik im Ethylenbereich des D<sub>2</sub>O-bR wird noch mit einem GF und der SVD in Abb. 4.56 ausgewertet und mit dem Analyseergebnis einer H<sub>2</sub>O-bR-Probe im selben Frequenzbereich verglichen. Die Transienten der beiden signifikantesten SVD-Spektren zerfallen monoexponentiell mit 2.3(3) ps bzw. 0.6(1) ps. Der GF findet eine Dynamik mit den beiden Zeitkonstanten 3.7(5) ps und 0.7(3) ps. SVD-Analyse und GF für die D<sub>2</sub>O-bR-Probe zeigen eine gute Übereinstimmung in der Größe und Anzahl der beteiligten Zeitkonstanten. Die SVD-Spektren und die entsprechenden GF-Spektren haben sehr ähnliche spektrale Verläufe. Bei etwa 1529 cm<sup>-1</sup> weisen beide Analysemethoden in den Spektren für die lange Zeitkomponente ein Minimum in Form einer Absorptionsbande auf, die mit der Position der Ethylenbleichbande übereinstimmt.

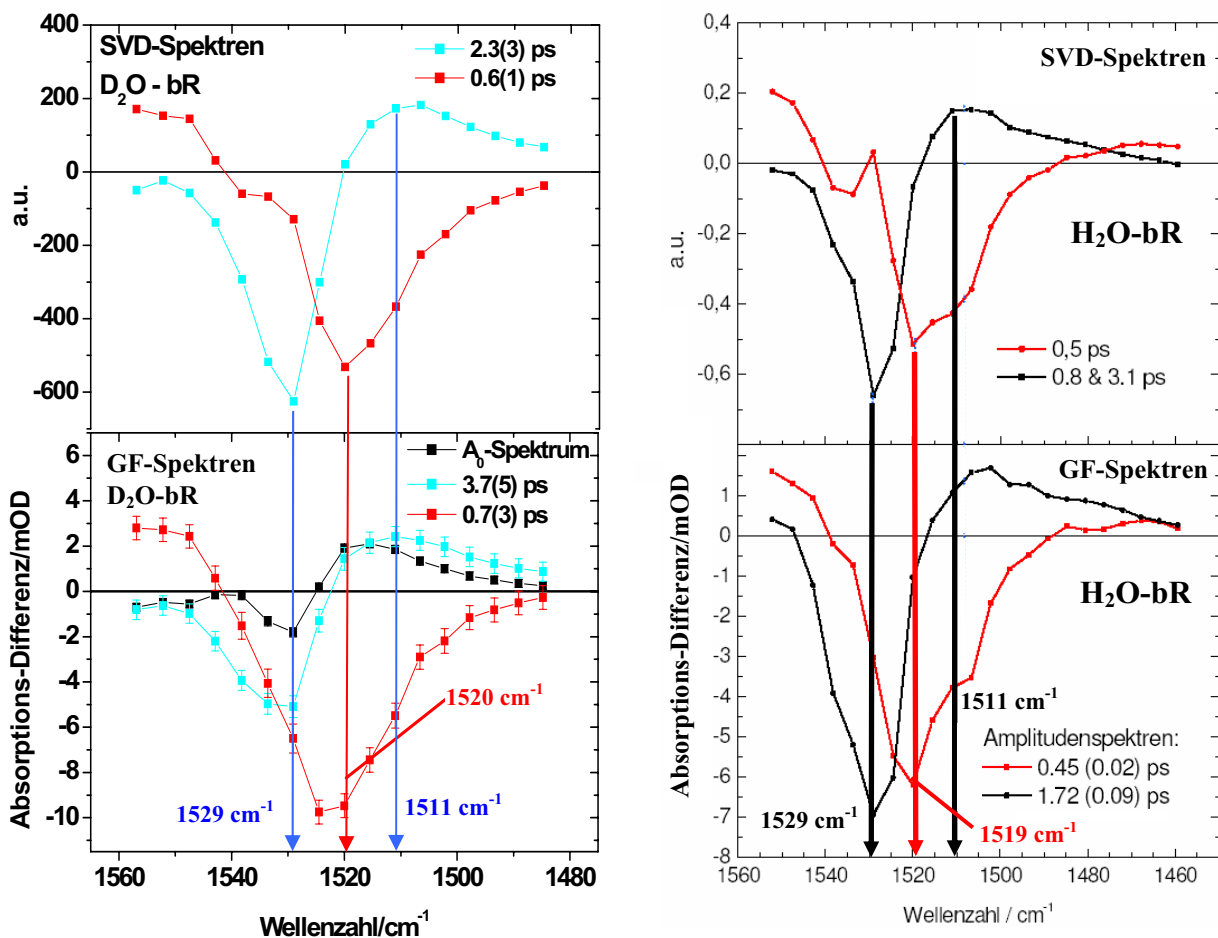


Abbildung 4.56: SVD und GF einer D<sub>2</sub>O-bR-Probe(links) und einer H<sub>2</sub>O-bR [Herbst2002/I] im Ethylenbereich.

Der Rückgang des Bleichsignals ist also mit der langen Zeitkonstante verknüpft. Bei 1519 cm<sup>-1</sup> (H<sub>2</sub>O-bR) bzw. 1520 cm<sup>-1</sup> (D<sub>2</sub>O-bR) zeigen beide Analysemethoden ein Minimum in den Spektren der kurzen Zeitkomponente. Bei dieser Position absorbiert die Ethylen-K-Produktbande. Die Spektren zeigen hier übereinstimmend die schnelle Entstehung einer Bande. Die Spektren für die langsame Zeitkonstante haben bei ca. 1511 cm<sup>-1</sup> ein Maximum. Bei 1511 cm<sup>-1</sup> absorbiert gerade das J-Intermediat (heißer K-Zustand). Die Maxima in den Spektren an dieser Stelle zeigen demnach den Zerfall, bzw. die Schwingungsabkühlung von J nach K. Der GF und die SVD-Analyse bestätigen sich gegenseitig ihre Ergebnisse. Die Ergebnisse für die D<sub>2</sub>O-bR-Probe im Ethylenbereich gelten auch für die H<sub>2</sub>O-bR-Probe, wie aus der Ähnlichkeit der SVD-Spektren und GF-Spektren in Abb. 4.56 ersichtlich ist<sup>1</sup>. Die Dynamik im Ethylenbereich einer bR-Probe ändert sich durch die Deuterierung kaum. Die Deuterierung zeigt hier keinen wesentlichen Einfluss auf die Dynamik.

#### 4.2.2.2 Dynamik im Schiffsche Base-Bereich

Betrachten wir nun die Ergebnisse im Schiffsche Base-Bereich der D<sub>2</sub>O-bR-Probe (C=ND-Bereich). Abb. 4.57/links zeigt die IR-Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten nach Photoanregung. Die Bande bei 1627(1) cm<sup>-1</sup> ist die Bleichbande der C=ND-Streckschwingung. Bei 1599(1) cm<sup>-1</sup> liegt die Bleichbande der C<sub>5</sub>=C<sub>6</sub>-Streckschwingung des Retinalchromophors [Diller1987]. Auf der rechten Seite von

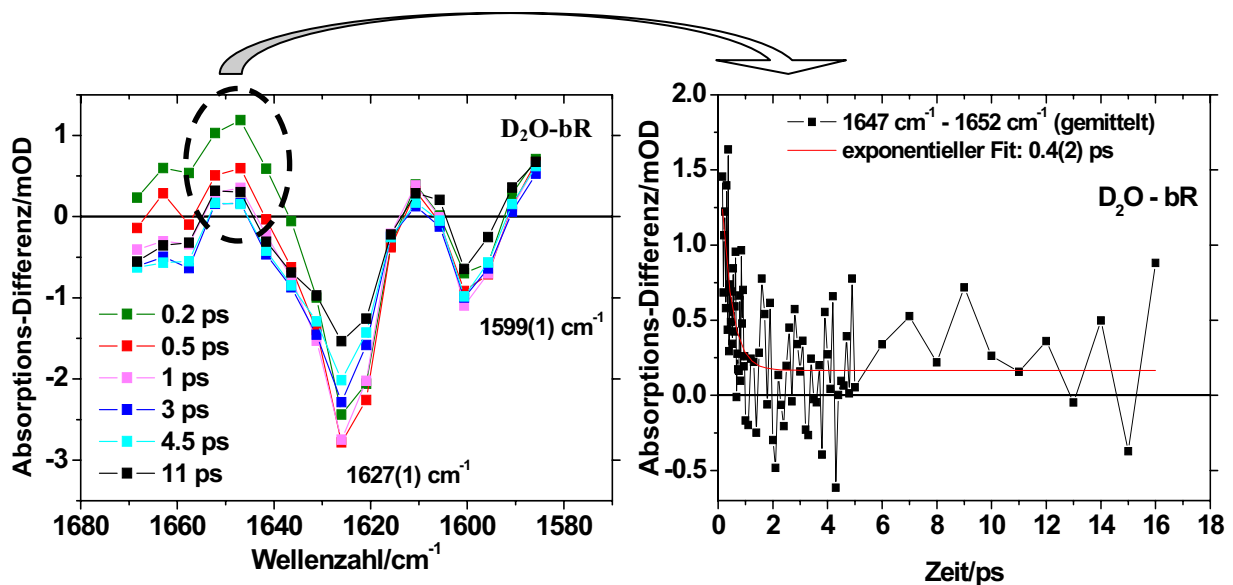


Abbildung 4.57: D<sub>2</sub>O-bR: Links: Differenzspektren zu diversen Zeiten im C=ND-Bereich. Rechts: Dynamik der gemittelten Transienten zwischen 1647 cm<sup>-1</sup> und 1652 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup> Das Minimum des 3,7 ps-GF-Spektrums ist bei 1529 cm<sup>-1</sup> schwächer als das 2,3 ps-GF-Spektrum beim H<sub>2</sub>O-bR ausgeprägt.

Abb. 4.57/rechts sind die über den Bereich 1647 cm<sup>-1</sup> bis 1652 cm<sup>-1</sup> gemittelten Transienten gezeigt. Auf der hochfrequenten Seite des C=ND-Bereiches ist zu 200 fs bereits ein positives Differenzsignal vorhanden (S<sub>1</sub>-Bande), das dann zerfällt. Die Zeitkonstante für den Zerfall ist 0.4(2) ps, was sich aus dem Fit der gemittelten Transienten ergibt und der Zerfallszeit des elektronisch angeregten Zustandes entspricht. Es liegt die Vermutung nahe, dass zwischen 1647 cm<sup>-1</sup> bis 1652 cm<sup>-1</sup> wie beim H<sub>2</sub>O-bR der Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes S<sub>1</sub> des D<sub>2</sub>O-bR beobachtet wird.

### GF und SVD im Schiffsche Base-Bereich der D<sub>2</sub>O-bR-Probe

Die Transienten im C=ND-Bereich werden mit einem globalen Fit und der SVD-Analyse ausgewertet. In Abb. 4.58 sieht man das Ergebnis der Analysemethoden. Die zu den beiden signifikantesten SVD-Spektren zugehörigen SVD-Transienten zerfallen mit den Zeiten 4.5(8) ps bzw. 0.4(2) ps.

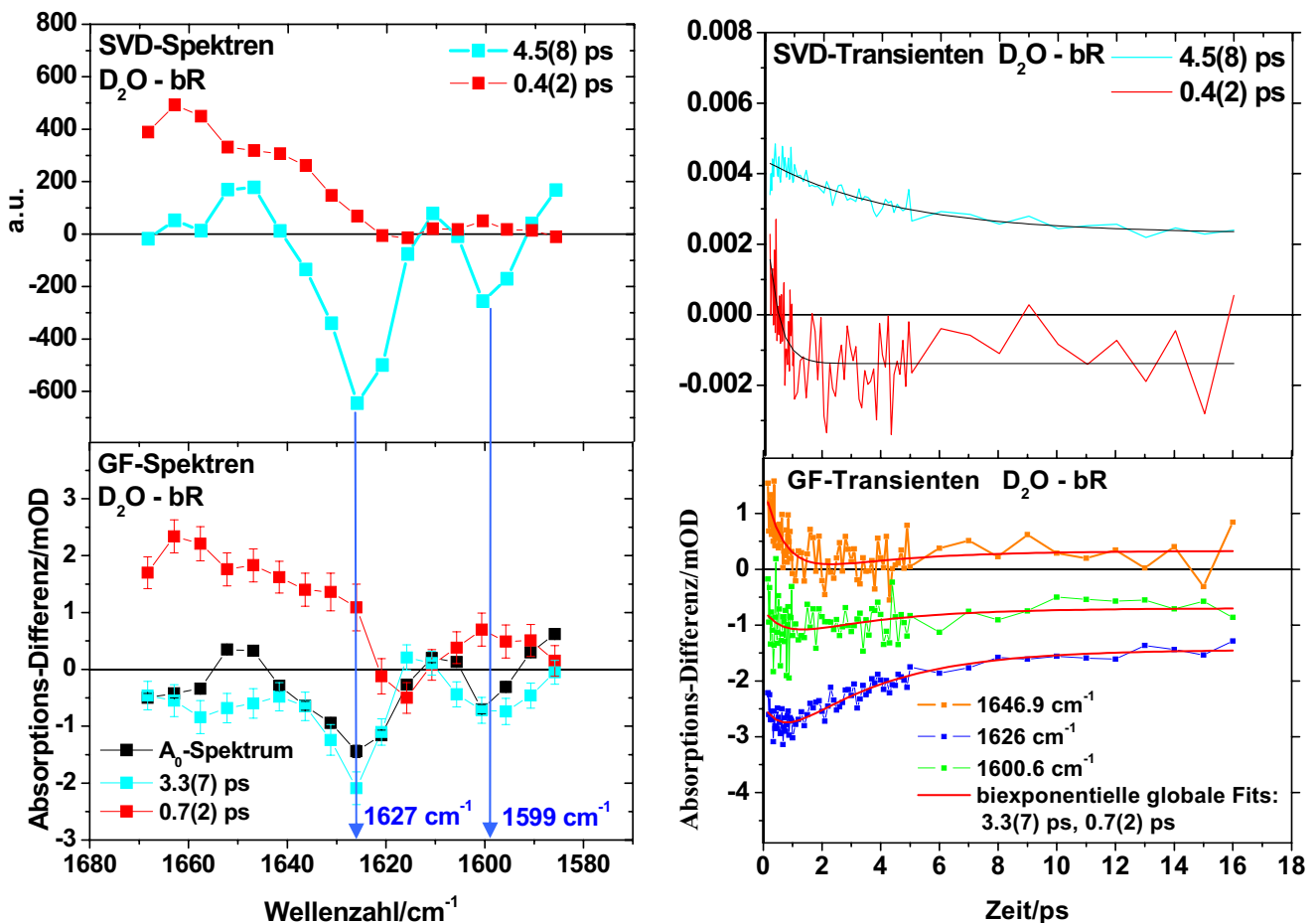


Abbildung 4.58: D<sub>2</sub>O-bR: SVD (oben/links und rechts) und GF (unten/links und rechts) im C=ND-Bereich.

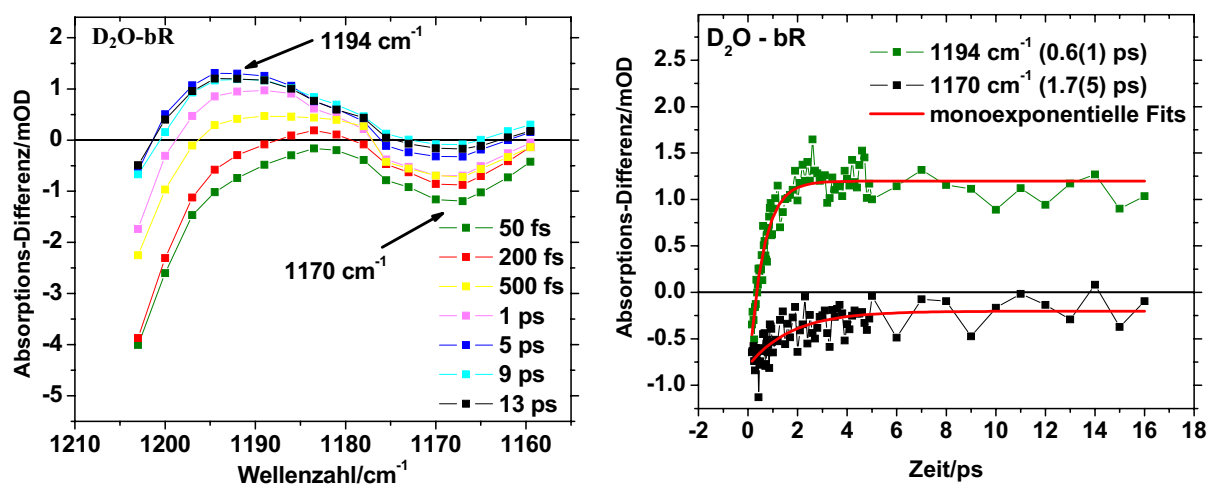


Gemäß der SVD-Analyse sind mindestens zwei Spezies während der Primärreaktion zu beobachten. GF und SVD-Analyse finden dieselbe Anzahl und Größe der Zeitkomponenten. Außerdem ist der Verlauf der Spektren ähnlich. SVD und GF bestätigen sich daher gegenseitig ihre Ergebnisse. Der Verlauf der SVD-Spektren und der GF-Spektren für die lange Zeitkomponente in der Nähe der Bleichbanden folgt gerade der Form der Bleichbanden: Sie zeigen, dass der Rückgang der Bleichsignale bei 1627 cm<sup>-1</sup> und 1599 cm<sup>-1</sup> maßgeblich durch die lange Zeitkomponente geprägt ist. Dem Rückgang der Bleichbanden ist der schnelle Zerfall von instantan vorhandenen, spektral breiten, positiven S<sub>1</sub>-Schwingungsbanden überlagert.

#### 4.2.2.3 Dynamik im Fingerprintbereich

Um die Isomerisierungsreaktion bei der D<sub>2</sub>O-bR-Probe zu untersuchen, wurden Daten im Fingerprintbereich aufgenommen, denn hier befinden sich die Markerbanden eines Retinalchromophors, der in 13-cis-Konfiguration vorliegt. Es wird überprüft, ob es Änderungen in Bezug auf die Dynamik der Primärreaktion bei der D<sub>2</sub>O-bR-Probe im Vergleich zu H<sub>2</sub>O-bR zu beobachten sind.

Abb. 4.59/links gibt die IR-Differenzspektren im Fingerprintbereich einer D<sub>2</sub>O-bR-Probe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Photoanregung wieder. Es zeigt sich das

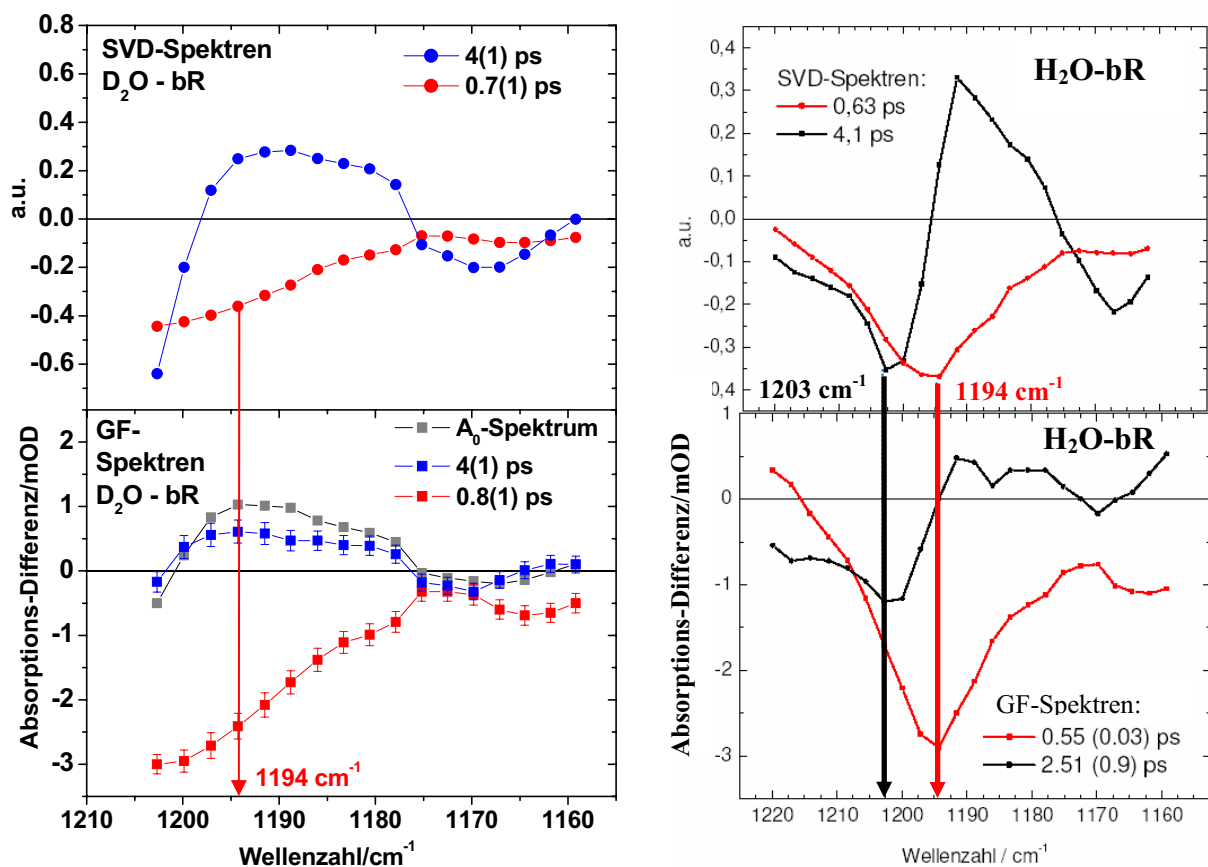


**Abbildung 4.59:** D<sub>2</sub>O-bR: Links: Differenzspektren zu diversen Zeiten im Fingerprintbereich. Rechts: Transienten im Bereich der Produktentstehung bei 1194 cm<sup>-1</sup> und in der Eduktrückbildung bei 1170 cm<sup>-1</sup>.

charakteristische Fingerprintmuster schon nach 0.5 ps in den Bleichbanden bei 1203 cm<sup>-1</sup> und 1170 cm<sup>-1</sup> und in der dazwischen liegenden 13-cis-Produktbande bei 1194 cm<sup>-1</sup>. Nach einer Pikosekunde sind die spektralen Veränderungen in der Produktbande nur noch klein. Das 13-cis-Produkt bei 1194 cm<sup>-1</sup> entsteht mit einer Zeitkonstante von 0.6(1) ps, wie aus Abb. 4.59/rechts ersichtlich ist. Diese Zeit ist gleich zu der gefundenen Zeit der J-Entstehung im Ethylenbereich bei 1511 cm<sup>-1</sup> aus Abb. 4.55. Der Rückgang des Bleichsignals bei 1170 cm<sup>-1</sup> ist mit 1.7(5) ps langsamer als die Produktentstehung.

### GF und SVD im Fingerprintbereich der D<sub>2</sub>O-bR-Probe

Die Transienten im gesamten Fingerprintbereich werden dem globalen Fit und der SVD-Analyse unterzogen. Abb. 4.60/links enthält das Ergebnis der Analysemethoden für D<sub>2</sub>O-bR, Abb. 4.60/rechts für H<sub>2</sub>O-bR [Herbst2002/I]. Der GF und die SVD-Analyse für D<sub>2</sub>O-bR zeigen viele Gemeinsamkeiten sowohl in der Größe der gefundenen Zeitkonstanten als auch im Verlauf der entsprechenden Spektren. Die Produktentstehung bei 1194 cm<sup>-1</sup> geschieht



**Abbildung 4.60:** SVD und GF im Fingerprintbereich von D<sub>2</sub>O-bR (links) bzw. H<sub>2</sub>O-bR (rechts) [Herbst2002/I]. Die blauen Spektren links entsprechen den schwarzen rechts.

über die kurze Zeitkomponente, was an der großen negativen Amplitude des 0.8 ps-GF-Spektrums zu erkennen ist. Bei dem 0.8 ps-GF-Spektrum liegt das Minimum jedoch bei etwa 1200 cm<sup>-1</sup>. Bei den D<sub>2</sub>O-bR-Proben ist das Problem, dass im Fingerprintbereich um 1200 cm<sup>-1</sup> D<sub>2</sub>O leider stark absorbiert, so dass dort die IR-Transmission deutlich unter 4 % lag, was für die Messung schon schwierig wird. Von 1204 cm<sup>-1</sup> bis etwa 1220 cm<sup>-1</sup> lag die IR-Transmission bei ~ 0 %, so dass hier leider keine Daten mehr aufgenommen werden konnten. Daher kann am hochfrequenten Rand der GF-Spektren nur festgestellt werden, dass die Amplitude der schnellen Zeitkomponente die Tendenz zeigt, im Betrag kleiner zu werden und das GF-Spektrum der langsamen Zeitkomponente im Betrag größer wird. Das deutet an, dass die Dynamik in der Nähe der Bleichbande am hochfrequenten Rand des Spektrums beginnt, tendenziell langsamer als die Produktentstehung abzulaufen. Interessant ist die positive Amplitude der langsamen Komponente im Bereich des Produktes. Das entstandene Produkt zerfällt wieder etwas. Entweder beobachtet man hier die J-K-Schwingungsabkühlung, oder die Schwingungsabkühlung des heißen Grundzustandes nach Photoanregung. Die SVD- und die GF-Spektren des D<sub>2</sub>O-bR können aufgrund des kleineren Wellenzahlbereiches nicht uneingeschränkt mit den Messungen an H<sub>2</sub>O-bR (Abb. 4.60/rechts) verglichen werden. Es kann jedoch gesagt werden, dass die gefundenen Zeitkonstanten für die Primärreaktion bei beiden bR-Proben verträglich (kurze Zeitkomponente) bzw. gleich sind (lange Zeitkomponente). Beim H<sub>2</sub>O-bR waren die Zeitkonstanten aus dem GF: 0.55(3) und 2.5(9) ps, und die SVD-Analyse lieferte 0.63 ps und 4.1 ps.

Unsere Messungen an D<sub>2</sub>O-bR zeigen, dass durch die Deuterierung der Probe die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung nicht wesentlich beeinflusst wird. Die Isomerisierung läuft jeweils mit einer kurzen Zeitkonstante von 0.8(1) ps (D<sub>2</sub>O-bR) bzw. 0.55(3) ps (H<sub>2</sub>O-bR) ab.

#### 4.2.2.4 Dynamische Wechselwirkung mit der Proteinumgebung

Gegenstand dieses Kapitels ist der Einfluss der Primärreaktion auf die Umgebung des Retinalchromophors. Durch die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung um die C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung des Chromophors ändern sich die Abstände zwischen dem Chromophor und z. B. Aminosäuren oder Wasser, das in dem Protein enthalten ist. Wir substituierten H<sub>2</sub>O gegen D<sub>2</sub>O. Abb. 4.61 zeigt das 11 ps-K-Spektrum einer D<sub>2</sub>O-bR-Probe im Vergleich zu dem 12 ps-K-Spektrum einer H<sub>2</sub>O-bR-Probe. Neben der Verschiebung der C=NH-Bleichbande von 1639 cm<sup>-1</sup> auf 1627 cm<sup>-1</sup> erkennt man<sup>1</sup>, dass die negative Schulter im 12 ps-K-Spektrum der H<sub>2</sub>O-bR-Probe (Abb. 4.61/unten) bei 1649 cm<sup>-1</sup> beim 11 ps-K-Spektrum der

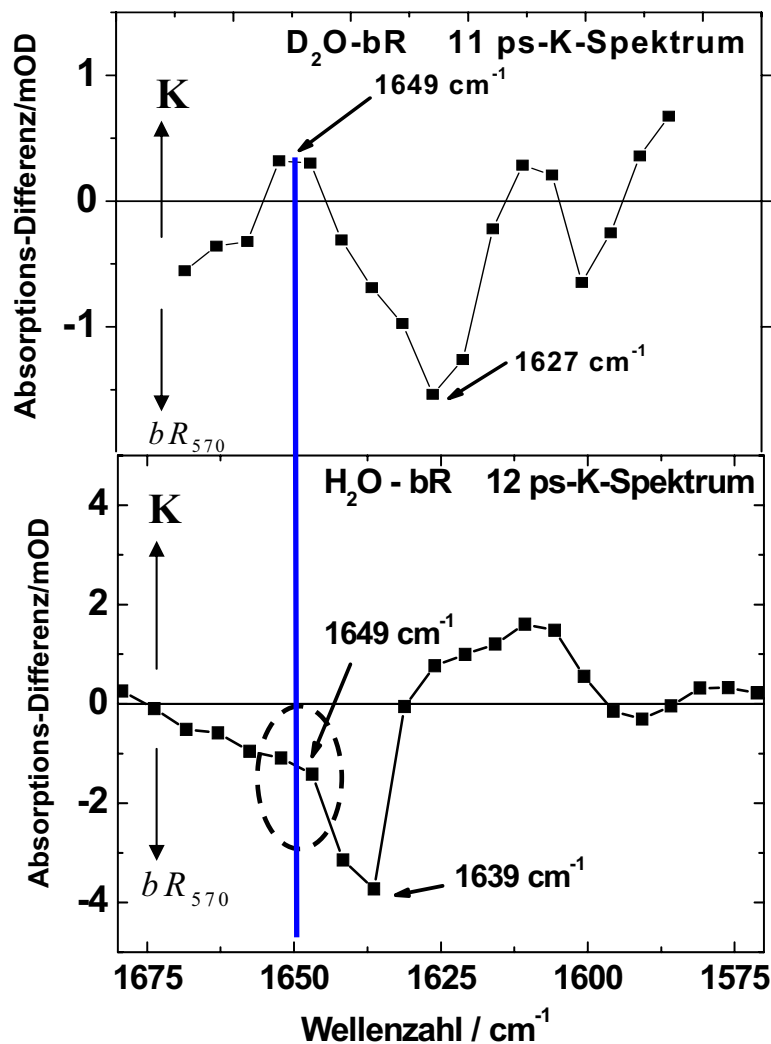


Abbildung 4.61: Vergleich des 11 ps-K-Spektrums einer D<sub>2</sub>O-bR-Probe (oben) mit dem 12 ps-K-Spektrum einer H<sub>2</sub>O-bR-Probe (unten).

<sup>1</sup> Die Verschiebung durch die Deuterierung müsste bei ~ 10 cm<sup>-1</sup> liegen [Aton1980][Argade1981].

D<sub>2</sub>O-bR-Probe nicht mehr vorhanden ist. Hier hat das Signal der D<sub>2</sub>O-bR-Probe eine positive Bande.

Zwischen der protonierten bzw. deuterierten Schiffischen Base und dem negativ geladenen Gegenion werden H<sub>2</sub>O- bzw. D<sub>2</sub>O-Moleküle angenommen [Hildebrandt1984]. Diese Wassermoleküle haben einen deutlichen Einfluss auf die Fixierung des Chromophors in der Proteintasche. Da um 1650 cm<sup>-1</sup> die Biegeschwingungen von H<sub>2</sub>O liegen, kann angenommen werden, dass der negativen Schulter bei 1649 cm<sup>-1</sup> der H<sub>2</sub>O-bR-Probe eine Schwingung eines H<sub>2</sub>O-Moleküls in der Nähe der Chromophor-Bindungsstelle, das durch die Isomerisierung räumlich in eine andere elektrostatische Umgebung verschoben wird [Edman1999][Luecke1999], zugeordnet ist. Hier zeigt sich also eine dynamische Wechselwirkung des Chromophors mit der Proteinumgebung. Aus der Röntgenstrukturanalyse gibt es Hinweise auf H<sub>2</sub>O-Moleküle in der Nähe der Chromophor-Bindungsstelle. Die spektrale Veränderung um 1649 cm<sup>-1</sup> könnte jedoch auch von einem anderen Molekül oder einer Molekülgruppe, wie z. B. einer Aminosäure, in der Nähe der Schiffischen Base stammen.

Die Messungen an einer D<sub>2</sub>O-Probe haben gezeigt, dass es keinen ausgeprägten Einfluss der Deuterierung auf die Dynamik der Primärreaktion gibt. Ein spektraler D<sub>2</sub>O-Effekt liegt jedoch vor, wie wir im Schiffischen Base-Bereich (spektraler Bereich der C=ND bzw. C=NH-Streckschwingung) gesehen haben.

### 4.2.3 Untersuchung der (13-cis, 15-syn)-Spezies $bR_{548}$ aus dem Grundzustand

Bakteriorhodopsin zeigt wie Halorhodopsin eine hell/dunkel-Adaption der Zusammensetzung des Ausgangszustandes. In Dunkelheit stellt sich im Grundzustand des  $bR$  innerhalb von ca. 20 Minuten [Kouyama1985] ein thermisches Gleichgewicht zwischen zwei unterscheidbaren Spezies ein: der all-trans-Spezies  $bR_{570}$  und der Spezies mit (13-cis, 15-syn)-Konfiguration des Retinalchromophors  $bR_{548}$ . Das Verhältnis der Konzentrationen der 13-cis-Spezies zu der all-trans-Spezies in Dunkelheit ist ungefähr 2:1 [Ihara1994]. Unter Lichteinfluss verwandelt sich  $bR_{548}$  in  $bR_{570}$ . Somit verschiebt sich das Verhältnis fast vollständig zum  $bR_{570}$  und liegt bei 2:98 [Kovács1993]. Beide Spezies aus dem Grundzustand haben ihren eigenen Photozyklus, wobei nur der all-trans-Zyklus mit dem Transport eines Protons verbunden ist.  $bR_{548}$  trägt nicht zum Protonentransport bei, da die Protonierungszustände der Asparaginsäuren in der Nähe der Schiffsbasis beim  $bR_{548}$  einen Protonentransport verhindern [Petrich1987]. Die Dauer des all-trans-Zyklus ist  $\sim 10$  ms und die des 13-cis-Zyklus beträgt  $\sim 35$  ms [Petrich1987]. In Abb. 4.62 sind die Strukturformeln von  $bR_{548}$  und  $bR_{570}$  dargestellt. Die Pfeile deuten die Einstellung des thermischen Gleichgewichtes in Dunkelheit innerhalb von 20 Minuten und die Umwandlung von  $bR_{548}$  in  $bR_{570}$  unter Lichteinfluss an. Abb. 4.63 zeigt die Photozyklen von  $bR_{548}$  und  $bR_{568}$  ( $bR_{570}$ ).

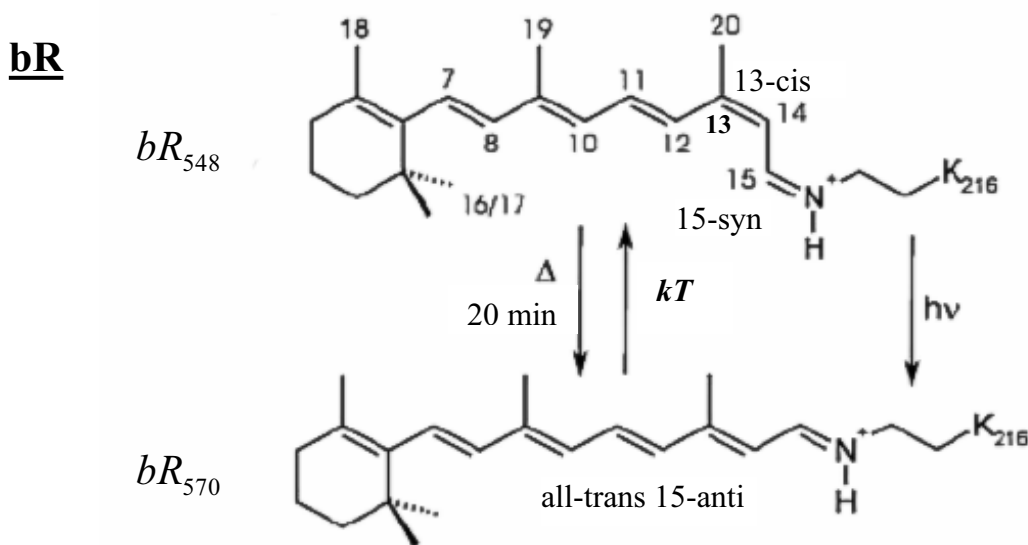
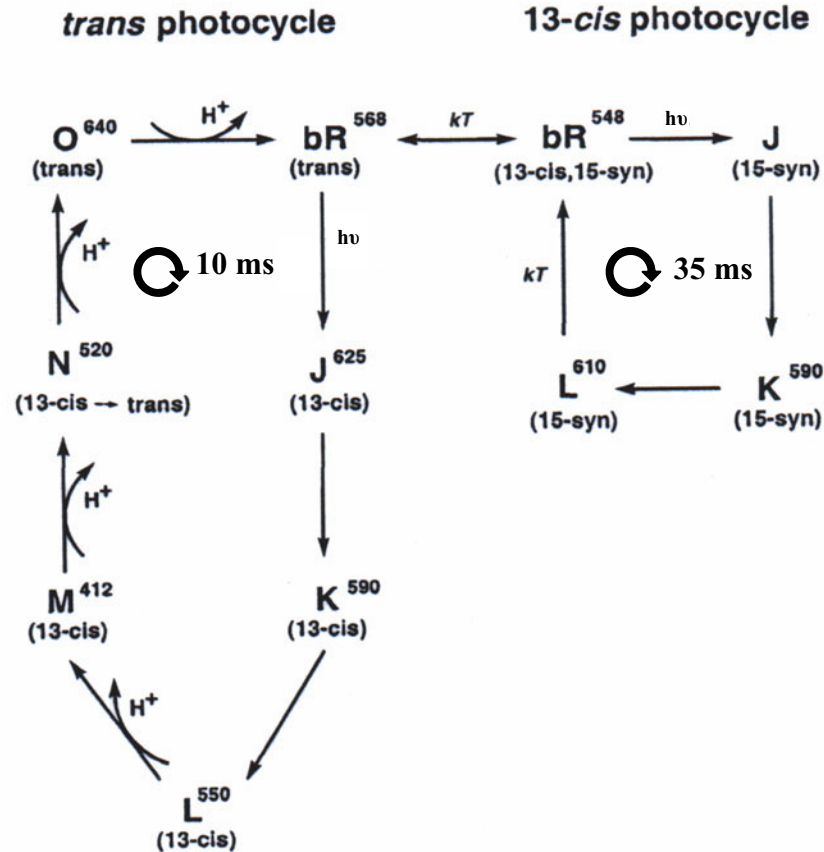


Abbildung 4.62: Strukturformeln von  $bR_{548}$  und  $bR_{570}$  [Patzelt2002].

**bR**

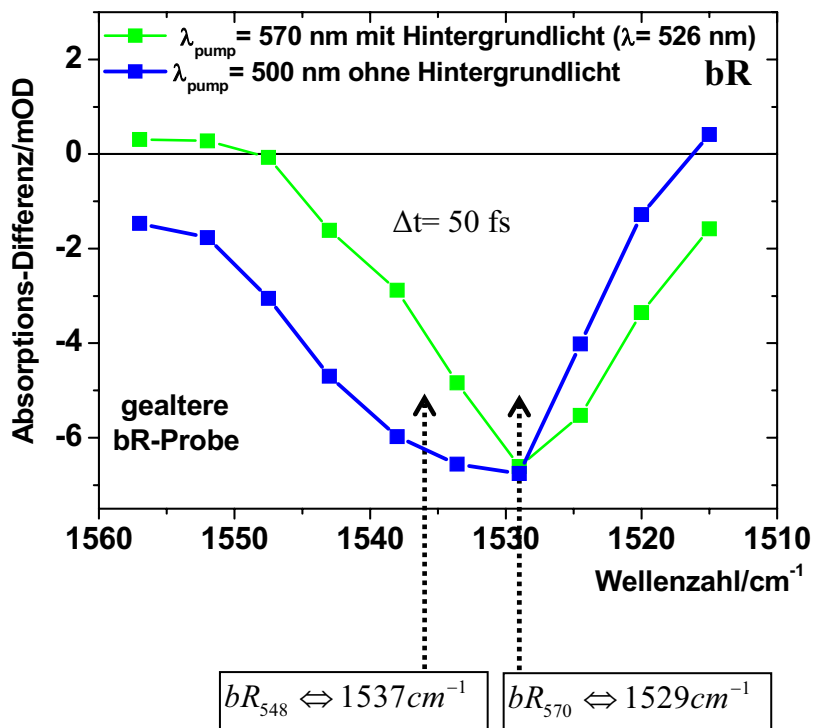


**Abbildung 4.63:** Photozyklen von  $bR_{548}$  und  $bR_{568}$  ( $bR_{570}$ ) [Logunov1996].

Bei Messungen an gealterten, d. h. länger als 10 Stunden im Experiment verwendeten bR-Proben, war uns aufgefallen, dass es bei einer Pumpwellenlänge von 500 nm im Ethylenbereich zu einer Verbreiterung der Ethylenbleichbande auf der hochenergetischen Seite des IR-Differenzspektrums kam. Auch zeigt sich in den statischen UV/VIS-Spektren gealterter Proben eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu kleineren Wellenlängen hin. Man könnte dies mit der Existenz der dunkel-adaptierten (13-cis, 15-syn)-Grundzustandsspezies  $bR_{548}$  erklären, deren Ethylenbande bei ca.  $1537\text{ cm}^{-1}$  liegt [Stockburger1986]<sup>1</sup>. Es stellt sich die Frage, wie groß der Einfluss von  $bR_{548}$  auf unsere Messungen an bR-Proben ist. Dazu wird die bewusst gealterte Probe zuerst bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm angeregt. Dieses Experiment wird ohne zusätzliche Hintergrundbeleuchtung durchgeführt. Bei 500 nm absorbiert  $bR_{548}$  stärker als  $bR_{570}$ .

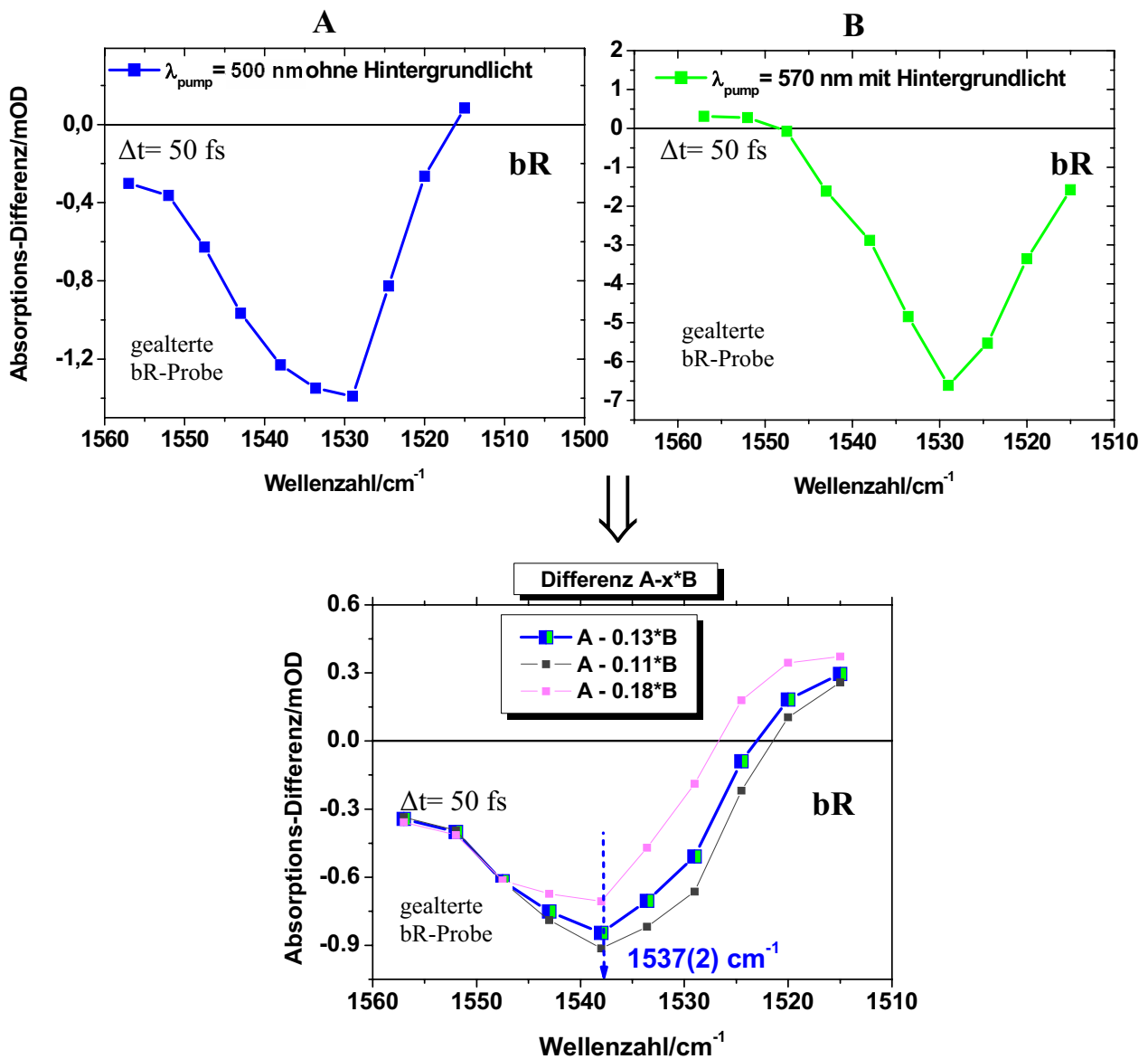
<sup>1</sup> Zwischen der protonierten Schiffischen Base und dem negativen Gegenion, das den Retinalchromophor im Grundzustand in seiner all-trans-Konfiguration stabilisiert, liegen  $H_2O$ -Moleküle, die ihrerseits zur all-trans-Stabilisierung beitragen [Hildebrandt1984]. Durch die Alterung der Probe kommt es vielleicht zu einer Verschiebung dieser  $H_2O$ -Moleküle bzw. zu einer gewissen Austrocknung, so dass vermehrt die 13-cis-Konfiguration des Retinalchromophors im Grundzustand favorisiert wird. Bei der dehydratisierten Form  $bR_{530}^{dh}$  liegt die Frequenz der C=C-Streckschwingung bei  $1540\text{ cm}^{-1}$  [Stockburger1986] und der Retinalchromophor weist die (13-cis, 15-syn)-Konfiguration auf. In unseren statischen IR-Transmissionsspektren zeigten sich allerdings keine Hinweise auf eine Austrocknung der Probe.

Dadurch regt man mehr die 13-cis-Spezies  $bR_{548}$  an. Die IR-Differenzspektren zeigen unter diesen Versuchsbedingungen stärkere Anteile der 13-cis-Spezies. In einem zweiten Experiment liegt die Anregungswellenlänge bei 570 nm. Dadurch wird die all-trans-Spezies verstärkt angeregt. Zusätzlich wird die Probe noch mit grünem Hintergrundlicht der Wellenlänge 526 nm bestrahlt. Dadurch soll die Konzentration der all-trans-Spezies gegebenenfalls noch erhöht werden. Die IR-Differenzspektren zeigen hierbei mehr spektrale Anteile der all-trans-Spezies. In Abb. 4.64 sind die gemessenen 50 fs-IR-Differenzspektren im Ethylenbereich einer gealterten bR-Probe unter den beiden verschiedenen Sätzen von Versuchsbedingungen gezeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren an deren Minimum auf gleiche Intensität skaliert. Bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm ist deutlich die Verbreiterung der Ethylenbande zur hochenergetischen Seite des Messfensters hin zu erkennen. Diese Verbreiterung könnte von der 13-cis-Spezies stammen, deren Ethylenstretschwingung bei ca.  $1537\text{ cm}^{-1}$  absorbiert. Um diese Frage zu klären, wird von dem Spektrum bei  $\lambda_{\text{pump}} = 500\text{ nm}$  das mit verschiedenen Faktoren skalierte Spektrum bei  $\lambda_{\text{pump}} = 570\text{ nm}$  abgezogen. Die berechneten Spektren betrachten wir in Abb. 4.65. In den Differenzen der Spektren (Abb. 4.65/unten) erkennt man bei  $1537(2)\text{ cm}^{-1}$  (Fit) eine



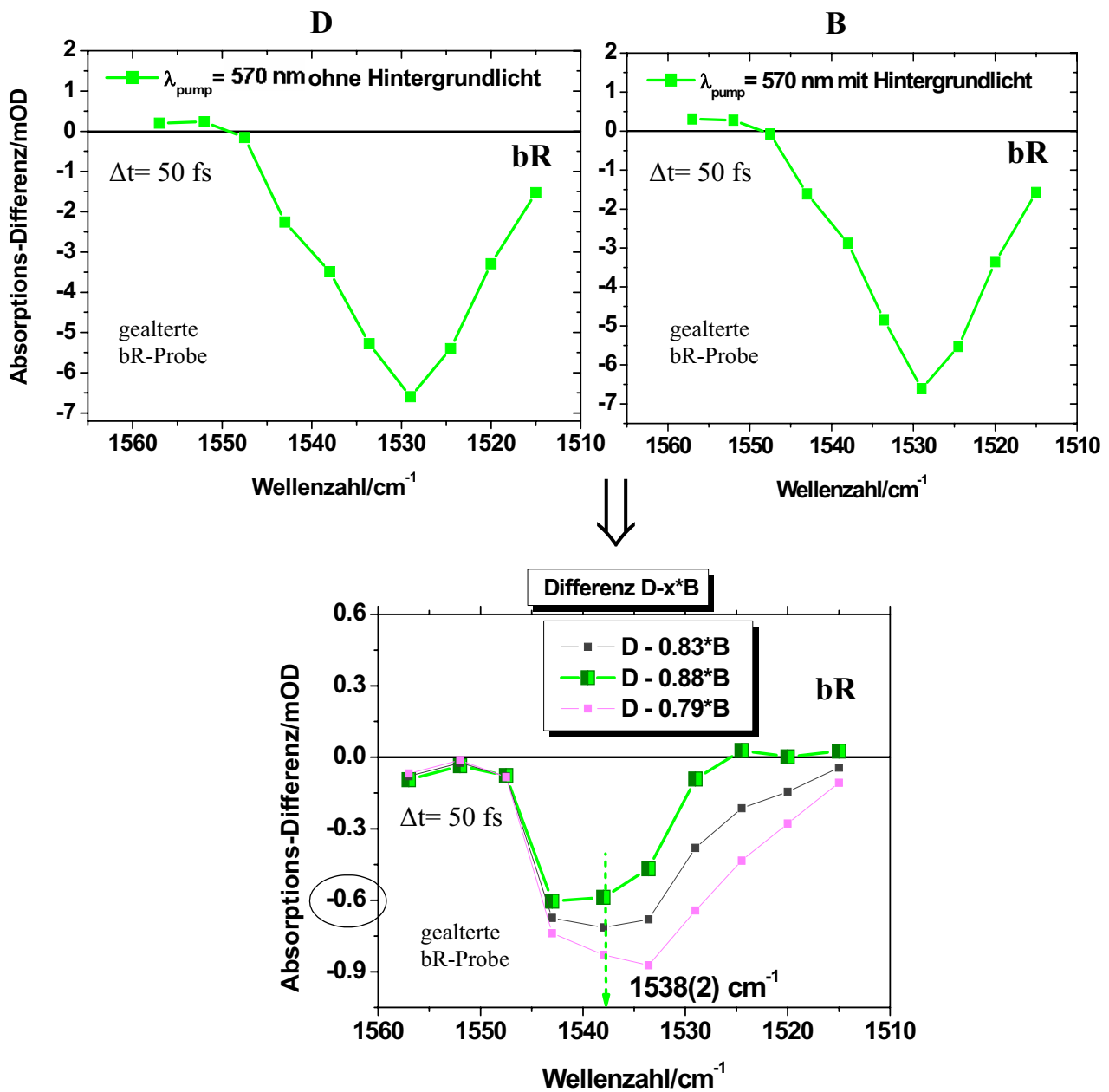
**Abbildung 4.64:** 50 fs- IR-Differenzspektren im Ethylenbereich einer gealterten bR-Probe bei den Anregungswellenlängen 500 nm (ohne Hintergrundlicht) und 570 nm (mit Hintergrundlicht ( $\lambda = 526\text{ nm}$ )).





**Abbildung 4.65:** Differenzbildung der 50 fs-IR-Differenzspektren einer gealterten  $bR$ -Probe bei den Anregungswellenlängen 500 nm (ohne Hintergrundlicht) und 570 nm (mit Hintergrundlicht).

Differenzbande (Minimum). Diese Position stimmt mit der Ethenbande der 13-cis-Spezies  $bR_{548}$  bei  $1537 \text{ cm}^{-1}$  überein. Es liegt daher nahe, der Bande bei  $1537 \text{ cm}^{-1}$  aus Abb. 4.65 die Ethenbande der 13-cis-Spezies  $bR_{548}$  zuzuordnen. Im nächsten Schritt wird untersucht, wie groß der Einfluss von  $bR_{548}$  bei gealterten  $bR$ -Proben bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm einmal mit und einmal ohne Hintergrundlicht ist. Abb. 4.66 gibt das Ergebnis dieser Messungen wieder. Die Ethenbleichbande liegt unabhängig vom Hintergrundlicht bei  $\sim 1529 \text{ cm}^{-1}$  (Minimum). Bildet man die Differenz der Spektren ohne und mit

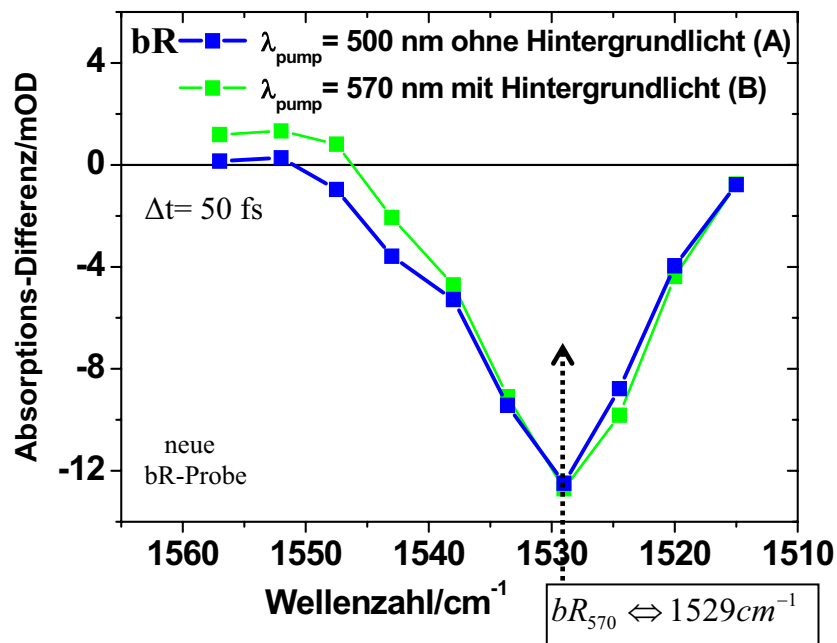


**Abbildung 4.66:** Differenzbildung der 50 fs-IR-Differenzspektren ohne und mit Hintergrundlicht einer gealterten  $bR$ -Probe bei der Anregungswellenlänge 570 nm.

Hintergrundlicht, so entsteht wieder eine Bande bei  $1538(2) \text{ cm}^{-1}$  (Fit), die zu der 13-cis-Spezies  $bR_{548}$  gehört. Die Bande hat nur eine Stärke von ca.  $-0.6 \text{ mOD}$  ( $D-0.88*B$ ). Setzt man diesen Wert in Relation zu der Stärke der IR-Differenzbande bei  $1529 \text{ cm}^{-1}$  von ca.  $-6.6 \text{ mOD}$ , so liegt ein nicht zu vernachlässigender Einfluss der 13-cis-Spezies von 9 % vor. Bei gealterten  $bR$ -Proben bringt das Pumplicht allein die Probe nahezu vollständig in den

hell-adaptierten Zustand. Es gibt aber noch einen Resteinfluss von 9 %, der selbst bei zusätzlicher Lichtadaption der Probe durch das Hintergrundlicht übrig bleibt.

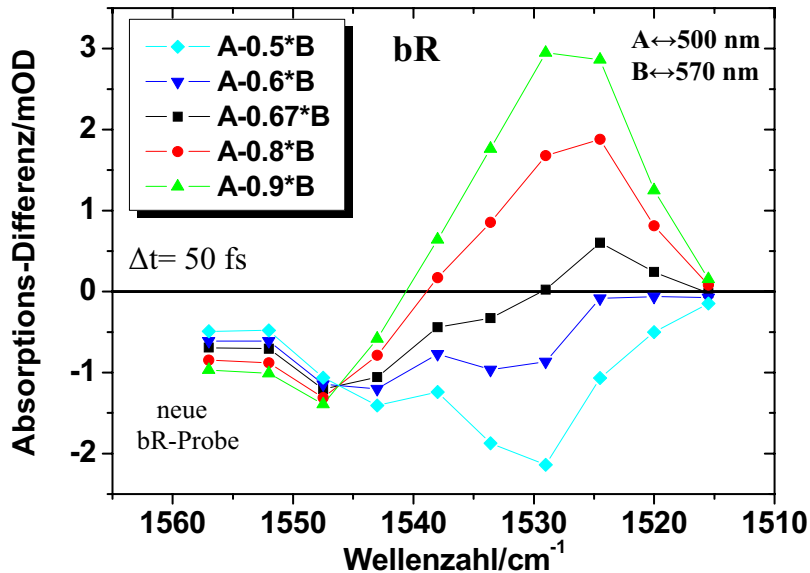
Vergleichen wir nun die letzten Messungen an gealterten bR-Proben mit Experimenten an neuen bR-Proben. Zuerst regen wir die neue Probe mit  $\lambda_{pump} = 500$  nm ohne Hintergrundbeleuchtung und dann mit  $\lambda_{pump} = 570$  nm mit Hintergrundbeleuchtung an. Betrachten wir das Ergebnis dieser Messung in Abb. 4.67. Die Spektren wurden auf die gleiche Intensität bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  skaliert. Sie sehen sehr ähnlich aus. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Messungen an der gealterten bR-Probe, bei denen sich die Spektren stark unterschieden (vgl. Abb. 4.64). Es zeigen sich kleine Differenzen auf der hochenergetischen Seite des gemessenen Spektralbereiches. Von dem Differenzspektrum bei  $\lambda_{pump} = 500$  nm („A“) soll das mit verschiedenen Gewichtungsfaktoren versehene Differenzspektrum bei  $\lambda_{pump} = 570$  nm („B“) abgezogen werden. Abb. 4.68 gibt das Ergebnis wieder. Bei



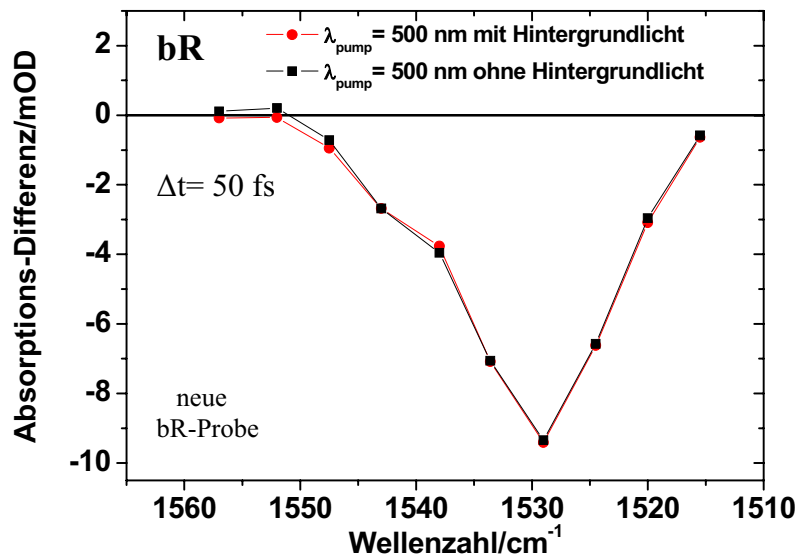
**Abbildung 4.67:** 50 fs- IR-Differenzspektren im Ethylenbereich einer neuen bR-Probe bei den Anregungswellenlängen 500 nm (ohne Hintergrundlicht) und 570 nm (mit Hintergrundlicht).

einem Skalierungsfaktor von 0.67 sind die Intensitäten der Spektren bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  gerade gleich. Es bildet sich diesmal jedoch keine spezifische  $bR_{548}$ -Bande um  $1537\text{ cm}^{-1}$  heraus.

Es soll noch untersucht werden, ob der 13-cis-Anteil bei einer neuen  $bR$ -Probe durch Hintergrundlicht beeinflusst wird. Dazu werden im Ethylenbereich bei  $\lambda_{pump} = 500$  nm



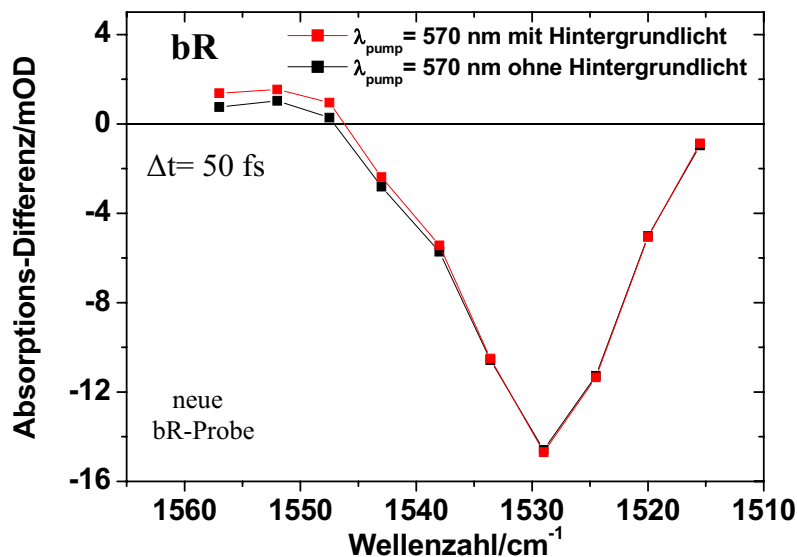
**Abbildung 4.68:** Differenzbildung der 50 fs-IR-Differenzspektren einer neuen  $bR$ -Probe bei den Anregungswellenlängen 500 nm/ohne Hintergrundlicht („A“) und 570 nm/mit Hintergrundlicht („B“).



**Abbildung 4.69:** 50 fs-IR-Differenzspektren im Ethylenbereich einer neuen  $bR$ -Probe bei der Anregungswellenlänge 500 nm. Einmal mit und einmal ohne Hintergrundlicht.

einmal mit und einmal ohne Hintergrundlicht IR-Differenzspektren aufgenommen. Abb. 4.69 zeigt diese beiden Spektren. Sie sind nahezu identisch. Dies bedeutet, dass das Hintergrundlicht den 13-cis-Anteil des Grundzustandes bei neuen Proben, falls er überhaupt

vorhanden ist, nicht weiter beeinflusst. Auch für die Pumpwellenlänge  $\lambda_{pump} = 570$  nm soll der Einfluss des Hintergrundlichtes auf die Zusammensetzung des Grundzustandes von neuen Proben untersucht werden. In Abb. 4.70 ist das 50 fs-IR-Differenzspektrum im Ethylenbereich bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm dargestellt, einmal mit und einmal ohne Hintergrundlicht. Die Spektren zeigen wieder keine Abhängigkeit vom Hintergrundlicht. Hieraus kann geschlossen werden, dass die neue bR-Probe bereits durch das Pumplicht in den hell-adaptierten Zustand übergeht und das zusätzliche Hintergrundlicht den 13-cis-Anteil nicht weiter verringert. Eine zusätzliche Beleuchtung mit Hintergrundlicht ist bei neuen bR-Proben daher nicht notwendig.



**Abbildung 4.70:** Einfluss des Hintergrundlichtes auf das 50 fs-IR-Differenzspektrum im Ethylenbereich einer neuen bR-Probe bei der Anregungswellenlänge 570 nm.

Bei gealterten bR-Proben wurde ein deutlich detektierbarer Einfluss auf unsere Messungen der 13-cis-Spezies  $bR_{548}$  aus dem Grundzustand beobachtet. Bei neuen bR-Proben ist der Einfluss vernachlässigbar klein. Da die Alterung der Proben mit einer Verschiebung des Maximums im statischen UV/VIS-Absorptionsspektrum zu kleineren Wellenlängen hin verbunden ist, verwenden wir die Lage des Absorptionsmaximums als objektives Kriterium für den Alterungszustand der Proben. Verschiebt sich das Maximum um mehr als 3 nm, so wird die Probe nicht weiter im Experiment verwendet.

### 4.3 Vergleich zwischen bR und HR

In diesem Kapitel sollen die Retinalproteine Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin in Hinblick auf die Isomerisierung des Retinalchromophors, der Dynamik im elektronisch angeregten Zustand und der Protein/Kofaktorwechselwirkung verglichen werden. Im Kapitel 4.3.4 werden schließlich die Reaktionsmodelle von bR und HR zueinander in Bezug gesetzt. Aus den Unterschieden bzw. Gemeinsamkeiten können Rückschlüsse gezogen werden, inwieweit z. B. die Proteinstruktur Einfluss auf die oben genannten Prozesse nimmt.

#### 4.3.1 Isomerisierung

Im Spektralbereich der C-C-Streckschwingungen des Retinalchromophors (Fingerprintbereich) liegen Markerbanden für die Isomerisierung. Bei Isomerisierung bildet sich das typische 13-cis-Muster in den Differenzspektren aus: Eine Produktbande bei ca.

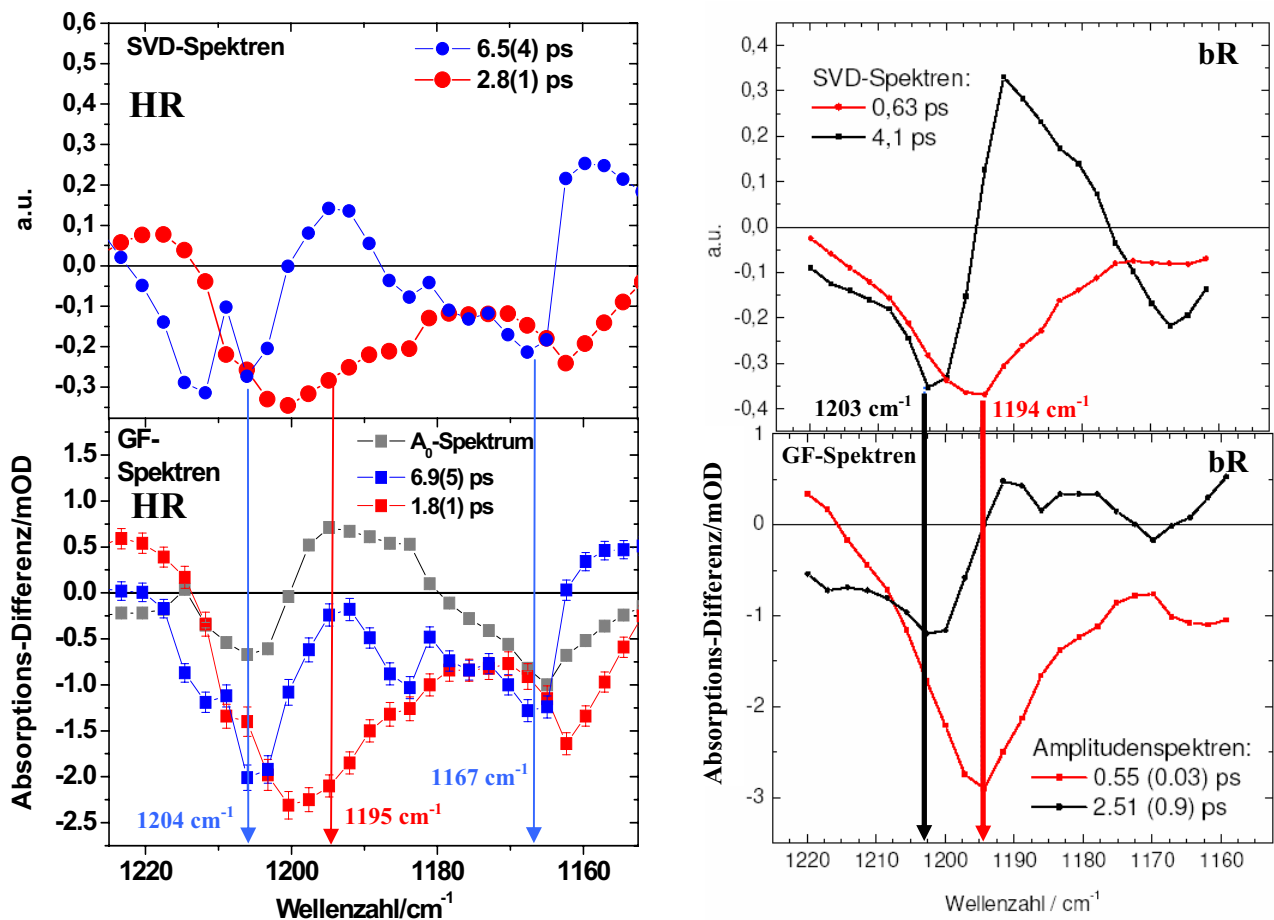


Abbildung 4.71: SVD und GF im Ethylenbereich von HR (links: diese Arbeit) und von bR (rechts: [Herbst2002/I]). Die blauen Spektren links entsprechen den schwarzen rechts.

1194  $\text{cm}^{-1}$  die von zwei Eduktbanden flankiert wird. Vergleichen wir zunächst den GF und die SVD-Analyse im Fingerprintbereich des HR (Abb. 4.71/links) mit denen des bR (Abb. 4.71/rechts). Die Entstehung der Produktbande beim bR geschieht mit 0.55 ps, was man an der Form einer separaten Absorptionsbande des 0.55 ps-GF-Amplitudenspektrum bei 1194  $\text{cm}^{-1}$  erkennen kann. bR führt also die all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung seines Retinalchromophors in 0.55 ps durch. Dabei entsteht das J-Intermediat, das ein heißer K-Zustand ist. Beim HR entsteht die 13-cis-Konfiguration des Retinalchromophors mit 1.8 ps. Diese Zeit ist deutlich länger als für bR. Der Rückgang der Bleichbanden geschieht sowohl beim bR als auch beim HR mit einer längeren Zeitkonstante. Die GF-Spektren der längeren Zeitkomponenten unterscheiden sich jedoch wesentlich zwischen 1175  $\text{cm}^{-1}$  und 1194  $\text{cm}^{-1}$ : Das unterschiedliche Vorzeichen der Amplituden der Zeitkonstanten beim bR weist auf eine sequentielle Reaktion hin. Dort ist beim bR an der positiven Amplitude des 2.51 ps-GF-Spektrums der Zerfall einer positiven Bande zu beobachten. Diesem Zerfall wird die Beobachtung der Schwingungsabkühlung des J-Intermediates zugeordnet. Die Abkühlung zeigt sich beim bR auch in dem Rückgang der Eduktbanden. Beim HR hingegen sind beide GF-Spektren in diesem Bereich negativ, was auf eine parallele Reaktion hindeutet.

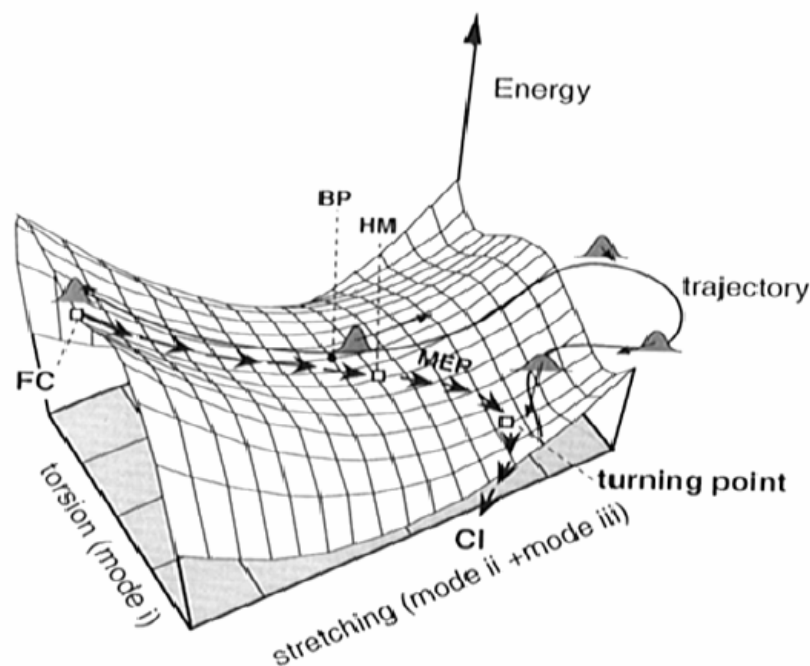
### 4.3.2 Dynamik im elektronisch angeregten Zustand

Obschon die  $S_1$ -Dynamik von bR oft untersucht wurde und es auch theoretische Ansätze dazu gibt, ist ein genaues, zweidimensionales Potentialbild der  $S_1$ -Oberfläche noch nicht erstellt worden. Es gibt jedoch ein Potentialbild von Systemen, die bR ähneln, das in erster Näherung auf das bR übertragen werden kann. In diesem Modell nimmt man an, dass das Wellenpaket nach Anregung des Grundzustandes eine schnelle Relaxation innerhalb von ca. 200 fs entlang einer hochfrequenten C=C-Streckschwingungsmode aus dem Franck-Condon-Zustand ausführt. Nach der Relaxation bewegt sich das Wellenpaket entlang einer Torsionskoordinate. Dieses Modell wird von „ab initio“-Berechnungen der Dynamik auf der  $S_1$ -Oberfläche vom minimalen PSBR-Modell *tZt*-penta-3,5-dieniminium cation, auch *cis*- $\text{C}_5\text{H}_6\text{NH}_2^+$  (i. w. minimales PSBR-Modellsystem) gestützt [Garavelli 1997]<sup>1</sup>. In Abb. 4.72 ist die  $S_1$ -Oberfläche des minimalen PSBR-Modellsystems dargestellt. Die Pfeile in Abb. 4.72

---

<sup>1</sup>Nach Photoanregung des Moleküls durchläuft dieses eine barrierefreie Relaxation auf der  $S_1$ -Oberfläche hin zu einer Konfiguration, wo der angeregte Zustand und der Grundzustand sich konisch durchschneiden. Am Durchschneidungspunkt liegt das Molekül mit einer um 80° gedrehten Zentralbindung vor, so dass effizient eine vollständige cis- zu trans-Isomerisierung eingeleitet wird. Daher ist das PSBR-Modellsystem ein brauchbares Modell für die beobachtete ultraschnelle (sub-Pikosekunden) Isomerisierungsdynamik des Retinalchromophors in Rhodopsin.

kennzeichnen den Weg minimalster Energie (MEP≡ Minimal Energy Pathway). Auf der  $S_1$ -

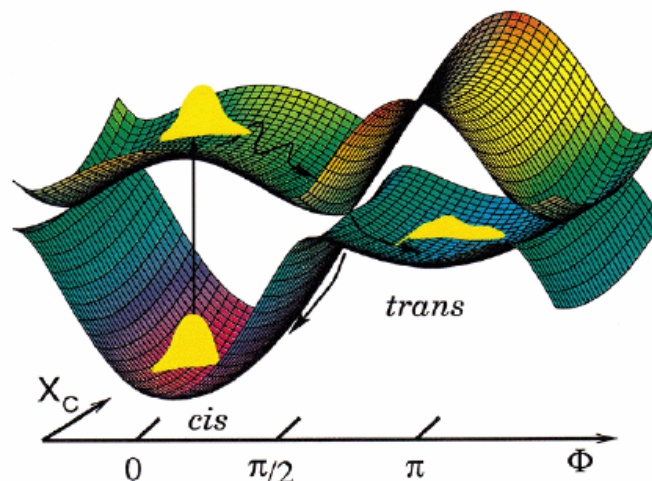


**Abbildung 4.72:** „Ab initio“-Berechnung der Dynamik auf der  $S_1$ -Oberfläche des minimalen PSBR-Modellsystems [Garavelli1997]. Die Potentialoberfläche wird von den Koordinaten einer C=C-Streckschwingungsmode und einer Torsionsmode aufgespannt. Die Bewegung des Wellenpaketes geht über die konische Durchschneidung (CI) wieder zurück in den elektronischen Grundzustand.

Oberfläche gibt es einen Verzweigungspunkt (BP≡ Bifurcation Point) und einen sogenannten „Twisting Point“ (TP), ab dem sich das Wellenpaket auch entlang der Torsionskoordinate bewegt. Für das Retinalprotein Rhodopsin konnte der Übergang durch die konische Durchschneidung experimentell bewiesen werden [Wang1994]. Mit Hilfe dieser Messungen wurde eine einfache adiabatische Darstellung der Potentialoberflächen gefunden und die Dynamik simuliert [Hahn2000]. Rhodopsin führt eine 11-cis- zu all-trans-Isomerisierung durch. Die Potentialoberflächen der cis-trans-Isomerisierung des Rhodopsins werden in Abb. 4.73 wiedergegeben. Das Wellenpaket verzweigt bei der konischen Durchschneidung bei  $\pi/2$ . Die Dynamik der Photoreaktion wird aus den berechneten Potentialoberflächen bestimmt [Hahn2000]. Die Resultate dieser Rechnungen bringen neue Ideen/Konzepte, die vielleicht auf die  $S_1$ -Dynamik von bR übertragbar sind.

Für bR besteht auf der  $S_1$ -Oberfläche nur ein Zustand,  $bR_I$  genannt, der innerhalb von 500 fs zerfällt [Dobler1988][Mathies1988][Herbst2002/II]. Von den Molekülen aus  $bR_I$  gehen 64 % in den Zustand  $bR_J$ , dem heißen K-Zustand. In  $bR_J$  ist der Retinal-





**Abbildung 4.73:** Adiabatische Potentialoberflächen des zwei-Zustands-Modells der cis-trans-Isomerisierung in Rhodopsin [Hahn2000].

chromophor bereits vollständig isomerisiert. 36% der Moleküle aus  $bR_I$  gehen in den heißen Grundzustand  $bR^*$ . Die Quantenausbeute der all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung beim bR beträgt demnach 64 %. Da bei den C=C-Streckschwingungen die Kopplung an das  $\pi$ -Elektronensystem ausgeprägt ist, wird man im Ethylenbereich die  $S_1$ -Dynamik gut beobachten können. In den IR-Differenzspektren im Ethylenbereich von bR aus Abb. 4.74/links ist eine instantan vorhandene Bande bei  $1570\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen, die dem elektronisch angeregten Zustand zuzuordnen ist. Abb. 4.74/rechts zeigt die Dynamik dieser  $S_1$ -Bande ( $1571\text{ cm}^{-1}$ ). Das Signal zerfällt mit  $0.55(6)\text{ ps}^{-1}$ . RR-Spektren weisen bei  $1570\text{ cm}^{-1}$  auch eine deutliche  $S_1$ -Schwingungsbande auf [Song1998].

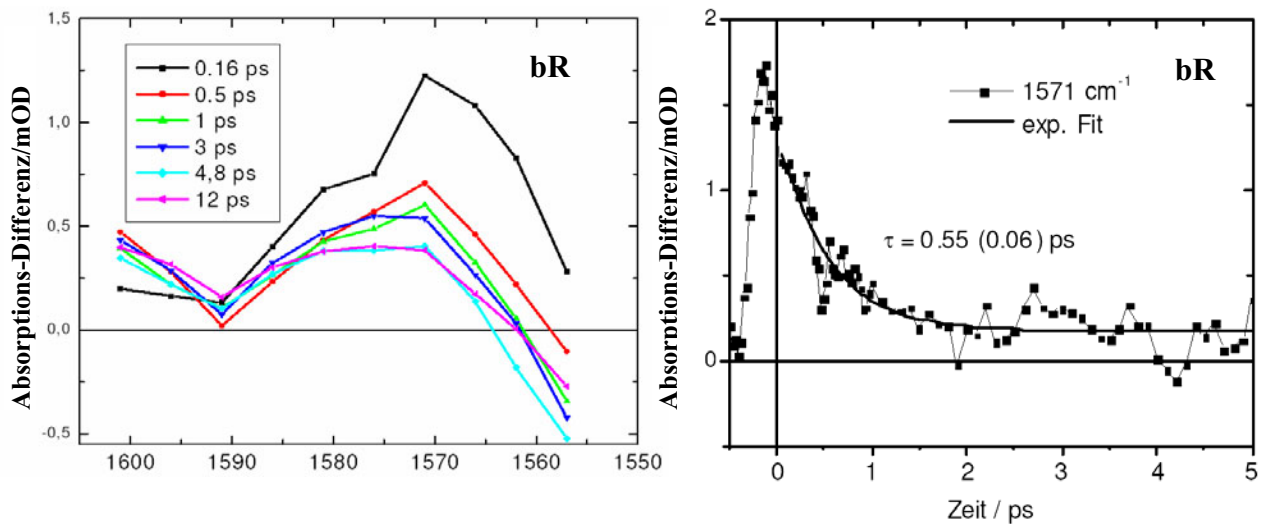
Im Vergleich hierzu spaltet sich das System beim Halorhodopsin im Franck-Condon-Zustand auf. Es geht auf der  $S_1$ -Oberfläche innerhalb von ca. 300 fs entlang zweier Reaktionskanäle: Einem reaktiven Kanal über die  $C_{13}=C_{14}$ -Isomerisierungscoordinate und einem nicht-reaktiven Kanal über eine allgemeine Koordinate hin zu zwei relaxierten Zuständen im  $S_1$ :  $S_1^{loss}$  und  $S_1^{iso}$  (siehe Abb. 4.32). Die beiden Zustände des  $S_1$  zerfallen mit deutlich unterschiedlichen Zeitkonstanten, was wir an dem verschieden schnellen Zerfall von instantan vorhandenen positiven IR-Differenzsignalen ( $S_1$ -Banden) erkennen konnten. Abb. 4.75 gibt den Zerfall von zwei instantan vorhandenen, positiven IR-Banden beim HR wieder. Die Transiente bei  $1563\text{ cm}^{-1}$  zerfällt mit  $2.4(3)\text{ ps}$  ( $S_1^{iso}$ ) wohingegen die Transiente bei  $1149\text{ cm}^{-1}$  mit  $9(2)\text{ ps}$  zerfällt ( $S_1^{loss}$ ).

Auch aus den VIS/VIS-Messungen an HR konnte nachgewiesen werden, dass der  $S_1$ -Zustand

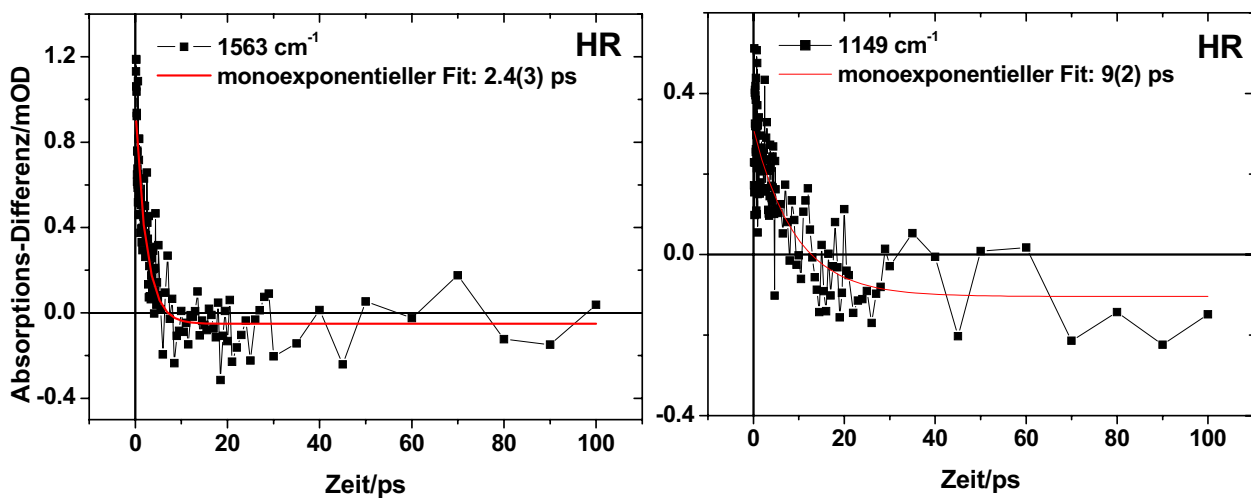
---

<sup>1</sup> Es wurden für bR keine anderen Zeitkonstanten für den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes gefunden.

mit zwei verschiedenen Zeitkonstanten zerfällt (Kapitel 4.1.3.3). Damit unterscheiden sich also die Zerfälle der elektronisch angeregten Zustände von bR und HR grundsätzlich. Eine interessante Frage ist, wie es zu diesen Unterschieden kommt.



**Abbildung 4.74:** bR: Links: IR-Differenzspektren im Ethylenbereich. Es ist der Zerfall einer instantan vorhandenen, positiven Differenzbande zu erkennen. Diese Bande ist der  $S_1$ -Zustand zuzuordnen. Rechts: Transiente bei  $1571\text{ cm}^{-1}$ . Die Bande bei  $1571\text{ cm}^{-1}$  zerfällt mit  $0.55(6)\text{ ps}$  [Herbst2002/I]. Für die Dynamik des Zerfalls des  $S_1$  wurde nur eine Zeitkonstante gefunden.



**Abbildung 4.75:** HR: Unterschiedliche Dynamik im  $S_1$ -Zustand. Links: schneller Zerfall bei  $1563\text{ cm}^{-1}$ , rechts: langsamer Zerfall bei  $1149\text{ cm}^{-1}$ .

### Auswirkung struktureller Details auf die S<sub>1</sub>-Dynamik

Die beim HR ermittelten Zeitkonstanten finden sich auch bei der Photoreaktion des protonierten, freien Retinals in Lösung PSBR [Hamm1997]. Auch die Quantenausbeuten sind bei HR und PSBR, 34 % bzw. 26 %, vergleichbar. Strukturelle Details des Proteins vor allem in der Nähe der Schiffsbasis werden eine Rolle bei der höheren Quantenausbeute beim bR und die unterschiedliche Reaktion im elektronisch angeregten Zustand spielen. Tauscht man z. B. beim bR die negativ geladene Asparaginsäure Asp<sub>85</sub> in der Nähe des Retinalchromophors gegen ein neutrales Asparagin (Asn) aus, so kommt es zu einer starken Verlangsamung der Photoreaktion: Sie läuft dann ebenfalls über zwei Zeitkonstanten, 2 ps und 10 ps, ab [Song1993]. Beim bR ist Asp<sub>85</sub> nur wenige Angström (4.1) von der Retinal-Polyenkette entfernt, was zu einer Wechselwirkung des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems des Retinalchromophors mit der negativen Ladung von Asp<sub>85</sub> führt. Auch läßt sich bR durch Substitution von Asp<sub>85</sub> gegen ein neutrales Threonin, was auch in diversen HR-Arten vorkommt, in eine Chloridionenpumpe umwandeln. Mit optischer fs-Spektroskopie wurde auch bei blauen Formen des bR, R82A<sup>1</sup> und R82C bei neutralem pH-Wert, ein biphasischer Zerfall des S<sub>1</sub> mit den Zeitkonstanten 1.7(3) ps und einer zweiten Zeit, die zwischen 6 ps und 12 ps liegt, beobachtet [Heyne2000]. Man kann daher die Ladung des Asp<sub>85</sub> teilweise verantwortlich machen für die Unterschiede zwischen bR und HR [Hamm1996]. Andererseits kann auch HR in ein „bR-ähnliches“ Protein umgewandelt werden. Beim HR fehlen ja Protonendonatoren und Protonenakzeptoren. Chlorid und Azid konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle. Durch Zugabe von Azid beim HR wird dessen Photozyklus dem des bR ähnlicher [Váró2000]. Dabei wird ein Proton über die Zellmembran transportiert [Váró1996]. Das gebundene Azid auf der extrazellulären Seite soll hierbei den Protonenakzeptor ersetzen, wobei ein anderes Azid die Rolle des Protonendonors spielt, indem es sich zwischen der Schiffsbasis und der cytoplasmatischen Oberfläche bewegt.

### 4.3.3 Protein/Kofaktor-Wechselwirkung

Beim bR und beim HR zeigt sich im Amid-II-Spektralbereich des Peptidgerüsts eine besondere Dynamik. Das Bleichsignal stellt sich beim HR verzögert mit einer Zeitkonstante

---

<sup>1</sup> Die Nomenklatur besagt, welche Aminosäuren getauscht wurden: R82A bedeutet, dass Arginin an Position 82 der Aminosäuresequenz gegen Alanin vertauscht wurde. Bei den blauen Formen ist Asp<sub>85</sub> ungeladen.

von 2.6(9) ps ein und zerfällt dann langsam mit 13(5) ps (Abb. 4.76/links). Die Dynamik beim bR ist ganz ähnlich, wie in Abb. 4.76/rechts zu sehen ist. Beim bR entsteht die Bleichbande verzögert mit einer Zeit von 0.5 ps bis 1 ps und zerfällt mit 9(4) ps. Interessant ist, dass die Entstehungszeit jeweils der Lebensdauer des  $S_1$  (bR) bzw. der reaktiven Spezies im  $S_1$  (HR) entspricht, was für eine durch die Isomerisierung bewirkte sterische Wechselwirkung des Retinalchromophors mit der Proteinumgebung spricht. Allerdings ist auch ohne Isomerisierung des Retinalchromophors, wie Messungen an bR mit geblocktem Retinal, bR5.12 zeigen konnten, bei  $1552\text{ cm}^{-1}$  ein ähnlicher Verlauf des Signals zu den Messungen an nativem bR zu finden [Herbst2002/I]. Messungen an einer HR-Probe mit einem geblockten Retinalchromophor könnten klären, ob beim HR die Proteindynamik durch die Isomerisierung beeinflusst wird.

Es ist auch möglich, dass durch die spektrale Nähe der negativen Amid-II-Bande zu den instantan entstehenden, positiven  $S_1$ -Banden es im Überlappungsbereich zur gegenseitigen Kompensation von positiven und negativen Signalen kommt. Die negative Bande wird erst sichtbar, wenn die positive Bande zerfallen ist und entsteht somit verzögert. Ein weiterer Grund für den verzögerten Anstieg kann die Dissipation der vom Chromophor absorbierten Energie in Proteinmoden innerhalb mehrerer

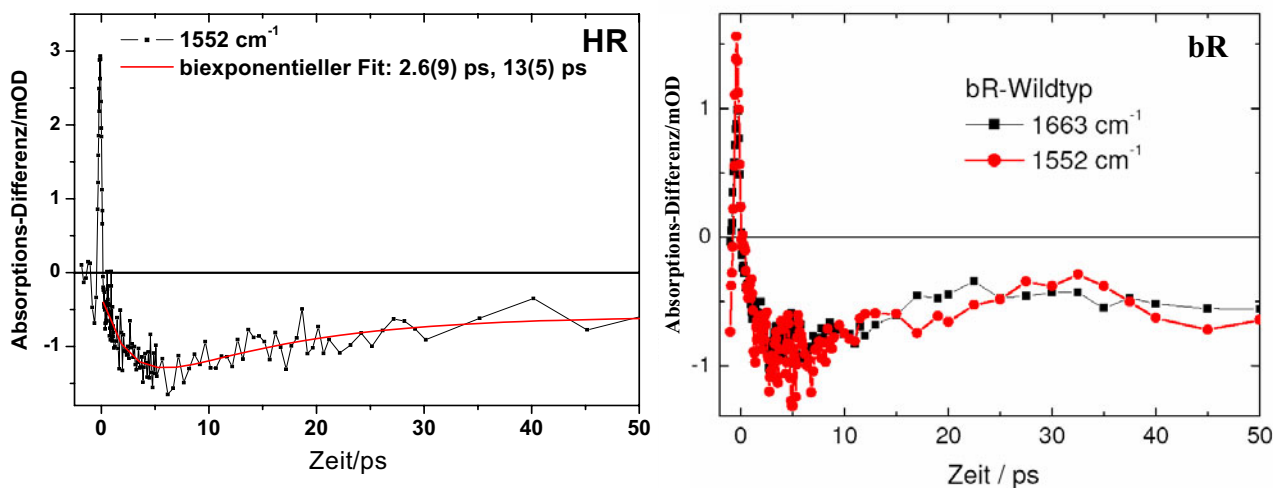


Abbildung 4.76: Besondere Dynamik im Bereich der Amid-II-Bande bei  $1552\text{ cm}^{-1}$ . Links: HR und rechts: bR [Herbst2002/I].

Pikosekunden sein. Die Proteinbanden aus dem Grundzustand  $HR_{578}$  verschwinden nicht genauso schnell wie die Chromophorbanden. Eine Veränderung der Ladungsverteilung in der Chromophorumgebung durch das veränderte Dipolfeld und dessen Zerfall beim Übergang in den elektronischen Grundzustand wäre ein weiterer Grund für den verzögerten

Anstieg. Bei Photoanregung ändert sich das Dipolfeld des Retinalchromophors sprunghaft. Durch das induzierte Dipolfeld werden z. B. geladene Molekülgruppen beschleunigt. Die Ladungsverteilung in der Chromophorumgebung wird durch das elektrische Dipolfeld derart beeinflusst, dass sich die Schwingungsübergänge von geladenen Aminosäuren oder die Biegeschwingung von Wassermolekülen verschieben, was zu einer sehr langlebigen Änderung im Protein führt, worauf die verbleibenden negativen Differenzsignale zu späten Zeiten in Abb. 4.76 hindeuten. Eine weitere Beeinflussung der Proteinumgebung könnte auch durch eine anfängliche Verdrillung des Retinalchromophors unmittelbar nach Photoanregung gegeben sein (vgl. Kapitel 4.2.1). Da beim bR die Dynamik der breiten HOOP-Differenzbande (vgl. Kapitel 4.2.1/Abb. 4.52) in etwa der Dynamik im Amid-II-Bereich entspricht, wäre eine Korrelation zwischen der Protein- und Verdrillungsdynamik vorstellbar, die auf einem gegenseitigen Einfluss der Verdrillung des Chromophors und dem Protein beruht.

#### 4.3.4 Reaktionsmodelle

Die Reaktionsmodelle zu den Primärreaktionen von bR und HR sollen in diesem Kapitel verglichen werden. Ein bemerkenswerter Unterschied im Ablauf der Primärreaktion beim HR im Vergleich zum bR besteht in der Aufspaltung in einen reaktiven und einen nicht-reaktiven Kanal im  $S_1$ -Zustand beim HR. Der elektronisch angeregte Zustand des HR zerfällt daher

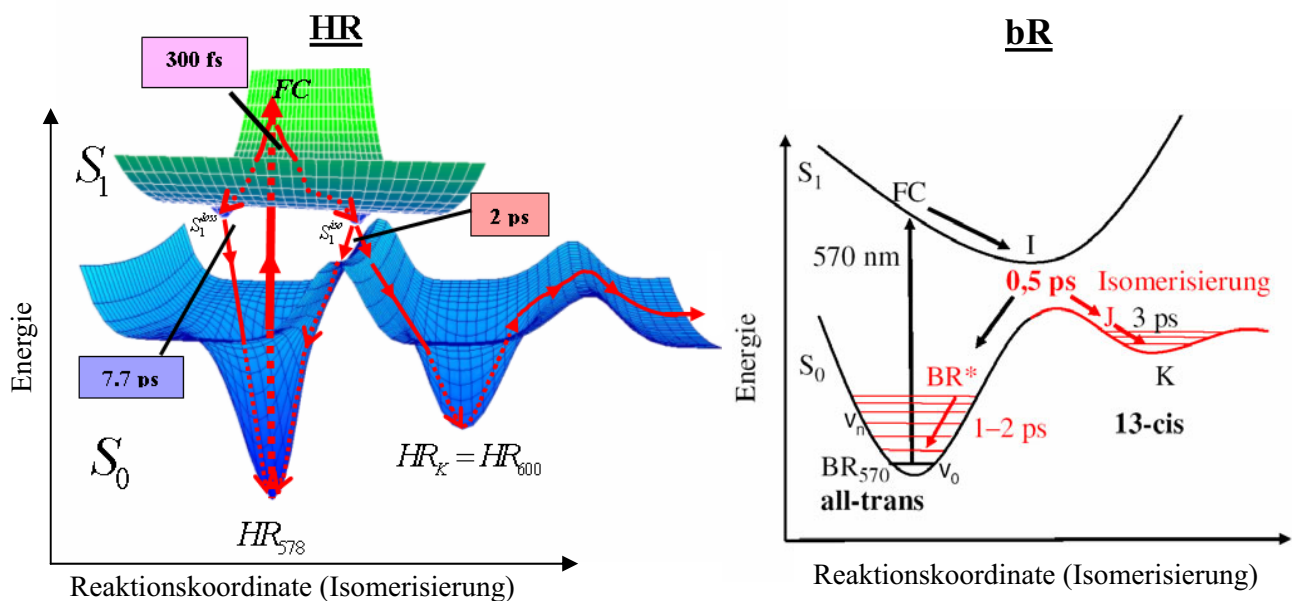


Abbildung 4.77: Links: Potentialschema von HR. Rechts: Potentialbild von bR [Herbst2002/I].

mit zwei unterschiedlichen Zeitkonstanten. Beim HR konnte gezeigt werden, dass die Produktentstehung mit der schnellen Zeitkonstante von ca. 2 ps geschieht. Der direkte Rückgang in den Grundzustand von der nicht-reaktiven Spezies  $S_1^{loss}$  im elektronisch angeregten Zustand läuft mit einer langsamen Zeitkonstante von  $\sim 7.7$  ps ab. Im Rückgang der Bleichsignale sind aber auch Anteile der schnellen Zeitkomponente enthalten, was zeigt, dass von der reaktiven Spezies  $S_1^{iso}$  im elektronisch angeregten Zustand auch ein Teil direkt wieder in den Grundzustand übergeht (vgl. Abb. 4.34). Schwingungsabkühlung konnte beim HR nicht eindeutig beobachtet werden. Beim bR hingegen teilt sich das System im elektronisch angeregten Zustand nicht in mehrere Kanäle auf, sondern es erreicht nur einen relaxierten Zustand im  $S_1$  innerhalb 200 fs:  $bR_I$ . Dieser Zustand zerfällt mit einer Zeitkonstante von 500 fs in den Produktzustand  $bR_J$ , einem heißen K-Zustand, der sich innerhalb von 3 ps nach  $bR_K$  abkühlt. 36 % der Intermediate in  $bR_I$  gehen direkt wieder in den heißen Grundzustand  $bR^*$  über, der dann in 2 ps bis 3 ps zum kalten Grundzustand  $bR_{570}$  wieder zerfällt. Beim bR gibt es im Gegensatz zu HR das negative Gegenion Asp<sub>85</sub> zur protonierten Schiffsbasis. Dadurch wird die protonierte Schiffsbasis in ihrer räumlichen Lage stabilisiert, was wiederum mit einer Stabilisierung der all-trans-Konfiguration des Retinalchromophors gegenüber der thermischen Isomerisierung (Dunkeladaptation, vgl. Kapitel 4.2.3) verbunden ist. Diese fehlende Stabilisierung bei HR könnte erklären, weshalb selbst im hell-adaptierten Zustand ca. 20 % des Grundzustandes aus 13-cis-Spezies besteht. Darüber hinaus wird die Photoisomerisierungsrate um die C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Doppelbindung im angeregten Zustand erhöht. Das Auftreten von zwei Zeitkonstanten beim HR kann, wie unsere Messungen gezeigt haben, nicht aus der Zuordnung von jeweils einer Zeitkonstanten zu einer Spezies, all-trans oder 13-cis, aus dem Grundzustand erklärt werden. Aufgrund der Analogien in den Zeitkonstanten zu den blauen bR-Formen R82A und R82C liegt auch bei diesen Formen die Annahme einer Verzweigungsreaktion im elektronisch angeregten Zustand näher als die Zuordnung der Zeitkonstanten zu jeweils einer Spezies all-trans und 13-cis aus dem Grundzustand. Messungen mittels transients IR-Schwingungsspektroskopie an den Mutanten R82A und R82C könnten deutliche Hinweise auf den Ursprung der Zeitkonstanten liefern. Die Reaktionsschemata von HR und bR sollen in Abb. 4.77 abschließend gegenübergestellt werden. Abb. 4.77/links ist das Potentialschema zur Primärreaktion des HR, Abb. 4.77/rechts stellt in den rot markierten Bereichen das durch Herbst et al. erweiterte bR-Potentialschema von Dobler und Mathies et al. [Dobler1988][Mathies1988] dar [Herbst2002/I].

## 4.4 *Sensorrhodopsin*

In diesem Kapitel sollen unsere ersten Experimente an NpSR-II-Filmen mit transienter IR-Schwingungsspektroskopie vorgestellt werden. Das pHtr-II-freie NpSR-II stammt vom *Natronobakterium Pharaonis*. SR-II gehört neben SR-I zu den phototaktischen Rezeptoren. Mit ihrer Hilfe kann das Bakterium eine gerichtete Bewegung in Bezug auf die Einstrahlungsrichtung des Lichts durchführen. SR-II pumpt während des Photozyklus kaum Protonen über die Zellwand<sup>1</sup>, lässt jedoch Protonen auf der extrazellulären Seite zirkulieren [Sasaki1999]. Dabei wird ein Proton von der extrazellulären Seite aufgenommen, wenn die Schiffsche Base des Retinalchromophors reprotoniert (Intermediat M geht in Intermediat O über) [Sasaki2000]. Dieses Proton wird dann bei der Deprotonierung der Aminosäure Asp<sub>73</sub>, also beim Übergang des Intermediates O zum Grundzustand am Ende des Photozyklus, wieder zur extrazellulären Seite abgegeben [Sasaki1999] (siehe Anhang).

### 4.4.1 Differenzspektrum im Ethylenbereich

Die Anregungswellenlänge lag bei 500 nm, gepulst wurde im Bereich der Ethylenschwingung um 1547 cm<sup>-1</sup>. Die Systemantwort betrug ca. 240 fs. Die Pulsenergie des Pumpimpulses lag bei maximal 0.75 µJ/Puls. Die Zyklusdauer der SR-II-Filme war ca. 350 ms. Das ist ein kleinerer Wert als in [Chizhov1998] (1.8 Sekunden) angegeben. In [Chizhov1998] wird die Zyklusdauer von einem Gleichgewichtszustand NpSR-II<sub>535</sub> mit einem anderen Zustand dominiert, der ein dem Grundzustand identisches Spektrum hat. In [Gellini2000] wird die Zeit für den Übergang von diesem Gleichgewichtszustand in den Grundzustand nur mit 400 ms angegeben, so dass die gesamte Zyklusdauer bei 600 ms liegt. Mit unserer Methode zur Ermittlung der Zyklusdauer, die aus Pumpen mit weißem Licht und Proben bei einer bestimmten Wellenlänge (540 nm) besteht, können wir den Gleichgewichtszustand nicht von dem Grundzustand unterscheiden.

In den optischen Spektren lag das Absorptionsmaximum bei ca. 497 nm, und es zeigten sich auf der niederenergetischen Seite mehrere Nebenmaxima, die von vibronischen Übergängen herrühren [Lutz2001/I]. In Abb. 4.78 ist das IR-Differenzspektrum im Ethylenbereich für verschiedene Zeiten gezeigt. Die Bleichbande liegt bei ca. 1548 cm<sup>-1</sup>, was mit der Lage der Bleichbande der Ethylenschwingung bei 1548 cm<sup>-1</sup> aus RR-Messungen

---

<sup>1</sup> Das pHtr-II-freie NpSR-II pumpt Protonen [Gordeliy2002][Wegener2000].

übereinstimmt [Gellini2000]. Am niederenergetischen Rand des gemessenen Spektralbereiches deutet sich zu späten Zeiten eine positive Bande an. In statischen FTIR-Spektren des K-Zustandes bei 103 K lag die K-Produktbande bei  $1542\text{ cm}^{-1}$  [Hein2003][Hein2004]. Um  $1570\text{ cm}^{-1}$  ist eine Produktbande instantan vorhanden. Diese Bande ließe sich einer Schwingungsbande im elektronisch angeregten Zustand zuordnen.

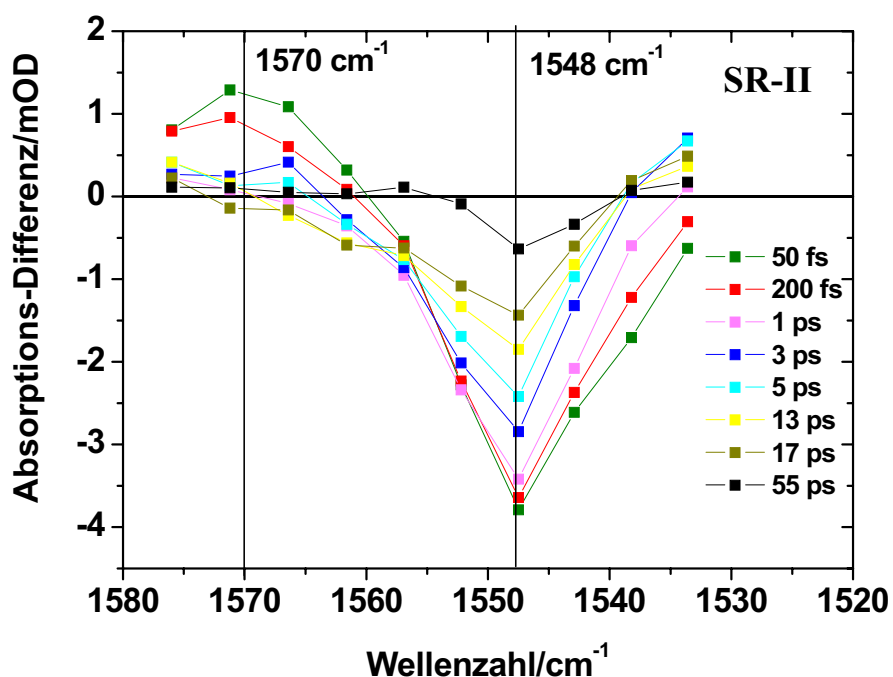


Abbildung 4.78: SR-II: IR-Differenzspektren im Ethylenbereich.

#### 4.4.2 Dynamik

Nach [Lutz2001/II] müssten sich beim NpSR-II drei Zeitkonstanten beobachten lassen:  $0.37\text{ ps}$ ,  $3.3\text{ ps}$  und  $53\text{ ps}$ <sup>1</sup>. In Abb. 4.79 sind der GF und die SVD des gesamt gemessenen Frequenzbereiches zu sehen. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen SVD und GF in der Anzahl und Größe der gefundenen Zeitkonstanten und im Verlauf der entsprechenden Spektren. Der multiexponentielle GF ist daher gerechtfertigt. Das  $20\text{ ps}$ -GF-Spektrum hat bei  $1549\text{ cm}^{-1}$  die Form der Bleichbande. Die Wiederkehr des Ausgangszustandes geschieht daher langsam. Im Bereich der Produktentstehung am niederenergetischen

<sup>1</sup>  $0.37\text{ ps}$  entsprechen dem  $S_1 \rightarrow S_0$  Übergang,  $3.3\text{ ps}$  und  $53\text{ ps}$  sind Dynamiken /Umwandlungen auf der  $S_0$ -Oberfläche zugeordnet. Die Primärreaktion durchläuft die Intermediate:  $SR-II_{497} \rightarrow SR-II_{FC} \xrightarrow{100\text{ fs}} SR-II_{545}^* \xrightarrow{370\text{ fs}} SR-II_{530}^J \xrightarrow{3.3\text{ ps}} SR-II_{520}^{JK} \xrightarrow{53\text{ ps}} SR-II_{510}^K$



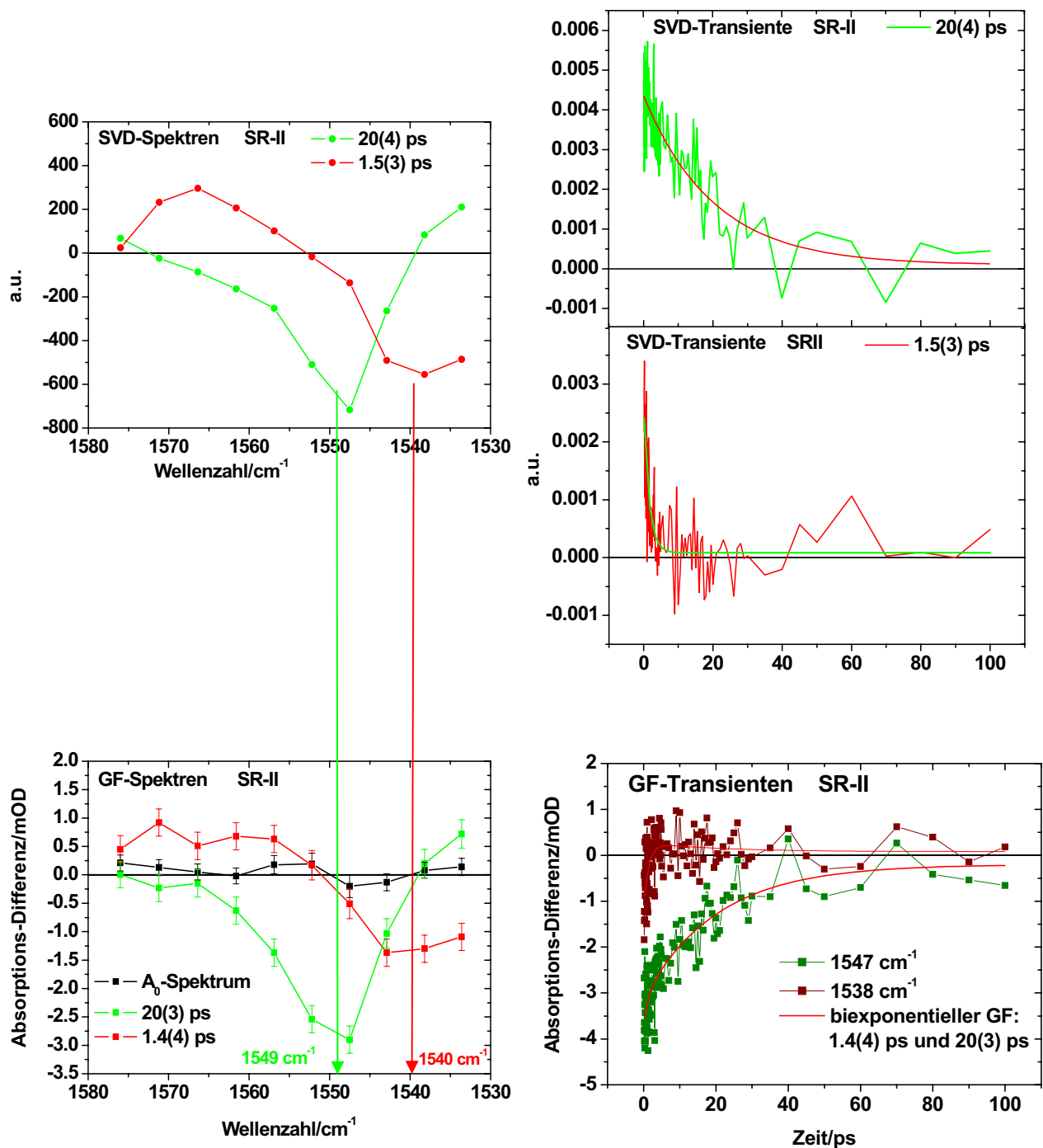


Abbildung 4.79: SR-II: GF und SVD im Ethylenbereich.

Rand des Spektrums deutet sich am Minimum des 1.4 ps-GF-Spektrums bei  $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$  die Entstehung des Produktes an. Die K-Produktentstehung läuft demnach mit einer kurzen Zeitkonstante um 1.4 ps ab. Bei  $1571 \text{ cm}^{-1}$  soll noch ein monoexponentieller Einzelfit durchgeführt werden. Abb. 4.80 gibt das Ergebnis dieses Fits wieder. Das instantan vorhandene Signal zerfällt mit  $0.6(3) \text{ ps}$ . Diese Bande lässt sich einer

Schwingungsbande im elektronisch angeregten Zustand zuordnen. Aus Messungen mit optischer fs-Spektroskopie wurde eine  $S_1$ -Lebensdauer von 0.37 ps ermittelt bzw. aus Fluoreszenzmessungen eine Lebensdauer von 0.75 ps berechnet [Lutz2001/II]. Innerhalb des Fehlers stimmt unsere gemessene  $S_1$ -Lebensdauer mit diesen Werten überein.

Der Umfang der Messungen reicht jedoch noch nicht aus, um ein vollständiges Reaktionsmodell für SR-II aufzustellen.

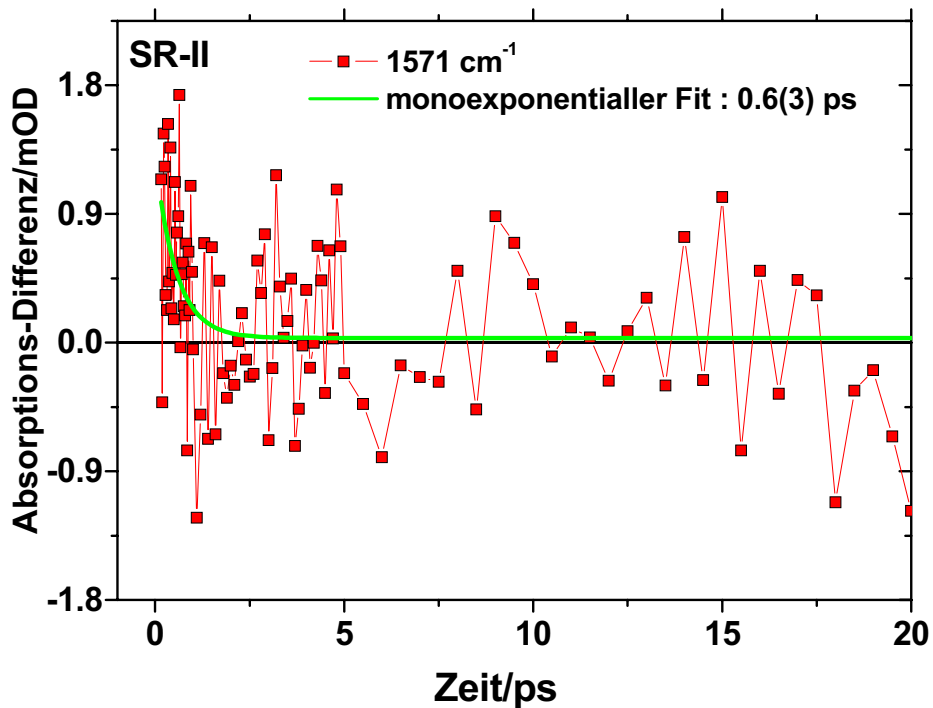


Abbildung 4.80: SR-II:  $S_1$ -Zerfall: Transiente bei  $1571 \text{ cm}^{-1}$  mit monoexponentiellem Fit.

### **4.5 VIS-IR-Spektroskopie an Farbstoffen (Polymethinische Theorie)**

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Rettig (HU-Berlin, Inst. f. Chemie: Prof. Dr. W. Rettig, Dipl. Chem. H. S. A. El-Gezawy) wurden hochzeitaufgelöste VIS(pump)/IR(probe)-Messungen an den Farbstoffen p-DPD-b13 und DASPI durchgeführt. Die Messungen sind durch erste Konsequenzen der „Polymethinischen Theorie“ [Dähne1966][Dähne1978] motiviert, die den stufenlosen Übergang von Doppel- zu Einfachbindungen vorhersagt. Von Rettig et al. wurde hierzu die Stilbenreihe veröffentlicht [Dekhtyar2001]. An Modellsubstanzen von Stilbazolium-Farbstoffen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der Phenylringe in diesen Farbstoffen eine Verlängerung der C=C-Doppelbindungen gegenüber den C-C-Einfachbindungen verhindert [Rettig2003]. Die polymethinische Schwelle (Cyanin-Limit: CL) ist bei Stilbenoiden mit sehr starkem Donor-Akzeptor-Charakter bereits überschritten [Rettig2003]. Daher führt nicht mehr die Drehung um die Doppelbindung zur strahlungslosen Auslöschung ( $\rightarrow$  Stilben oder DCS), sondern eine Drehung um die Einfachbindungen [VanDerMeer2001]. Aus theoretischen Betrachtungen ist bekannt, dass für Polyene und vor allem für Stilbene der Doppelbindungscharakter der Zentralbindung nach Photoanregung verkleinert wird, wobei die benachbarten Einfachbindungen mehr Doppelbindungscharakter erhalten. Dabei sollten sich auch die Kraftkonstanten der korrespondierenden Schwingungen verändern. Unsere Experimente können Aufschluss geben über den Einfach- oder Doppelbindungscharakter der Zentralbindung der unsymmetrischen Polymethine im elektronisch angeregten Zustand wie im Folgenden ausgeführt ist. Für die anderen Messungen an den Retinalproteinen bR und HR ließen sich eventuell auf Grundlage der Ergebnisse für DASPI und p-DPD-b13 ein Ansatz finden, um die spektrale Position der  $S_1$ -Schwingungsbanden zu ermitteln und auf den genauen Mechanismus der all-trans- zu 13-cis-Isomerisierung zu schließen.

#### **4.5.1 Die Farbstoffe p-DPD-b13 und DASPI**

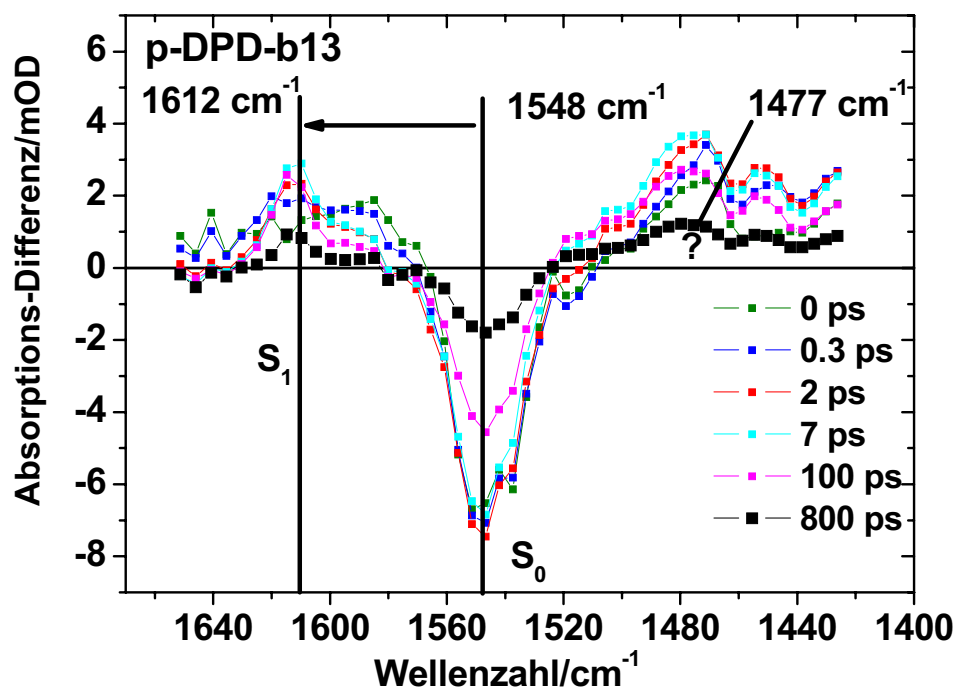
Für das Stilben-Derivat DASPI, einem Farbstoff mit starkem Donor-Akzeptor-Charakter (Stilbazolium-Farbstoff) und p-DPD-b13 (siehe Abb. 1.12), einem doppelt-überbrückten Derivat (stiff-model) müsste sich die Frequenz für die Ethylenstreckschwingung des elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$  gegenüber dem Grundzustand  $S_0$  erhöhen.

Die  $S_1$ -Lebensdauer von p-DPD-b13 liegt je nach Lösungsmittel bei einer oder mehrerer Nanosekunden [VanDerMeer2000], die  $S_1$ -Lebensdauer des DASPI unter 100 ps.

Die Farbstoffe wurden in Trideutero-Acetonitril (Acetonitril-d<sub>3</sub>) gelöst. Acetonitril-d<sub>3</sub>, ein starkes dipolares Lösungsmittel, hat eine hohe Transmission im Messbereich um 1550 cm<sup>-1</sup>. Die gelösten Farbstoffe wurden in CaF<sub>2</sub>-Küvetten gefüllt; die Probendicke war jeweils ca. 0.5 mm. Die optische Dichte der p-DPD-b13-Probe beim Absorptionsmaximum von 500 nm lag bei ca. 0.9 OD. Die DASPI-Probe wies bei ihrem Absorptionsmaximum von 460 nm eine optische Dichte von ca. 1.5 OD auf. Die Pumpwellenlänge für die DASPI-Probe wurde auf 480 nm eingestellt bei einer Pulsdauer von 70 fs und einer Einzelpulsenergie von 0.75 µJ/Puls. Für p-DPD-b13 verwendeten wir eine Pumpwellenlänge von 500 nm bei 70 fs Pulslänge und 0.9 µJ/Puls. Die Systemantwort lag bei jeweils ca. 260 fs.

#### 4.5.1.1 Spektren

In Abb. 4.81 sind IR-Differenzspektren von p-DPD-b13 zu verschiedenen Zeiten gezeigt. Die Frequenz der C=C-Streckschwingung verschiebt sich um +64 cm<sup>-1</sup> von 1548 cm<sup>-1</sup> für den Grundzustand S<sub>0</sub> auf 1612 cm<sup>-1</sup> (2 ps-Spektrum) für den elektronisch angeregten Zustand S<sub>1</sub><sup>1</sup>.

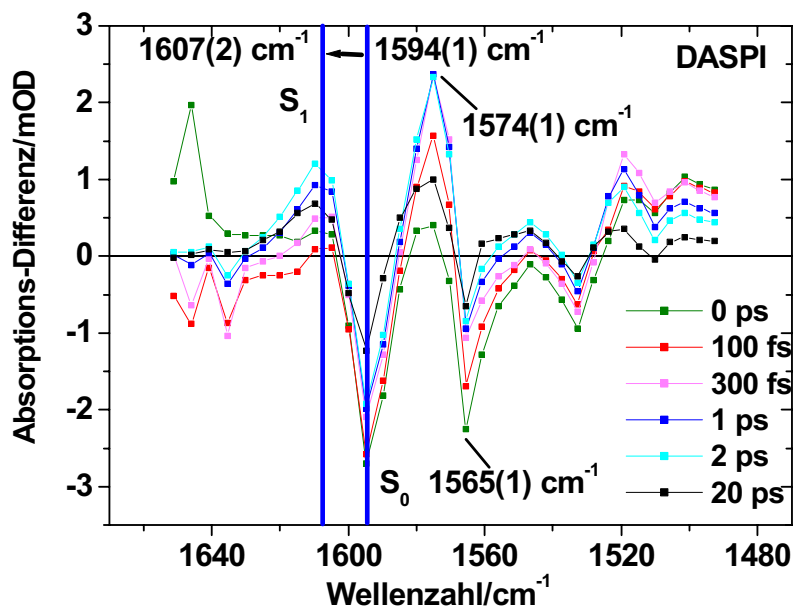


**Abbildung 4.81:** p-DPD-b13: IR-Differenzspektren. Beim Übergang in den elektronisch angeregten Zustand kommt es zu einer signifikanten Verschiebung der Ethylenbande von +64 cm<sup>-1</sup>.

Abb. 4.82 gibt die IR-Differenzspektren von DASPI zu verschiedenen Zeitpunkten nach Photoanregung wieder. Beim Übergang S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub> verschiebt sich die Position der C=C-

<sup>1</sup> Zu der zweiten, breiten Produktbande bei 1477 cm<sup>-1</sup> gibt es Hinweise aus theoretischen Normalmoden-Berechnungen von Rettig et al.. Diese legen nahe, dass es zwei S<sub>1</sub>-Banden der C=C-Streckschwingung geben könnte, eine oberhalb und die andere unterhalb von der S<sub>0</sub>-Ethylenbande bei 1548 cm<sup>-1</sup> (persönliches Gespräch mit Prof. Dr. W. Rettig) (DASPI analog).

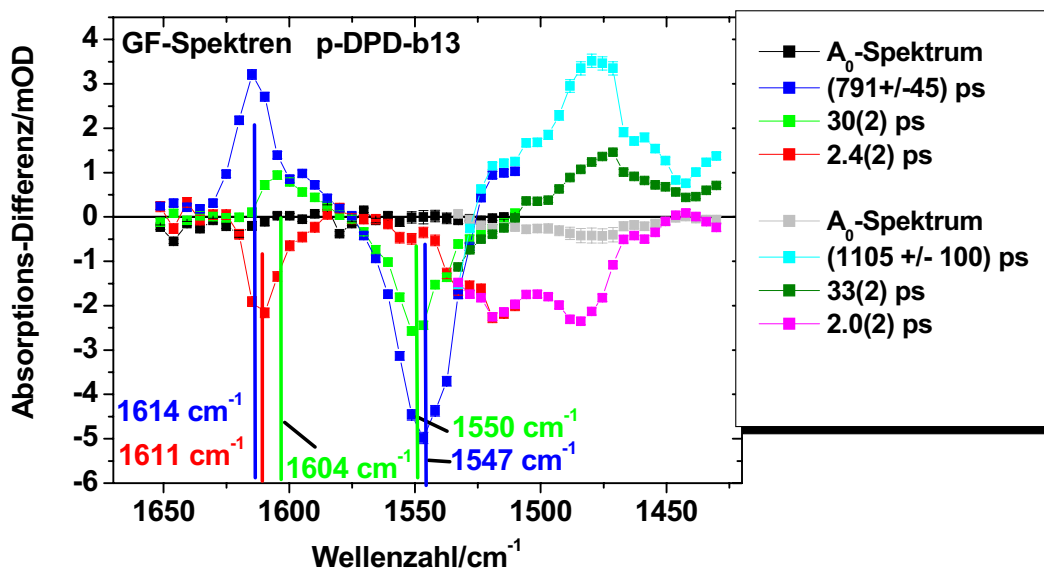
Streckschwingung um  $+13(2) \text{ cm}^{-1}$  von  $1594(1) \text{ cm}^{-1}$  auf  $1607(2) \text{ cm}^{-1}$  (1 ps Spektrum) <sup>1</sup>.



**Abbildung 4.82:** DASPI: IR-Differenzspektren. Das 1 ps-IR-Differenzspektrum wurde mit zwei Lorenzkurven im Bereich der Banden bei  $1594 \text{ cm}^{-1}$  und  $1607 \text{ cm}^{-1}$  gefittet. Die C=C-Bande verschiebt sich um  $+13(2) \text{ cm}^{-1}$ . Bei der  $S_1$ -Produktbande bei  $1574(1) \text{ cm}^{-1}$  könnte es sich um eine C=C-Schwingungsmode handeln, die im Grundzustand bei  $1565(1) \text{ cm}^{-1}$  absorbiert (Eduktbande). Dann läge die Verschiebung für dieses Edukt/Produkt paar bei etwa  $9(2) \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.5.1.2 Dynamik

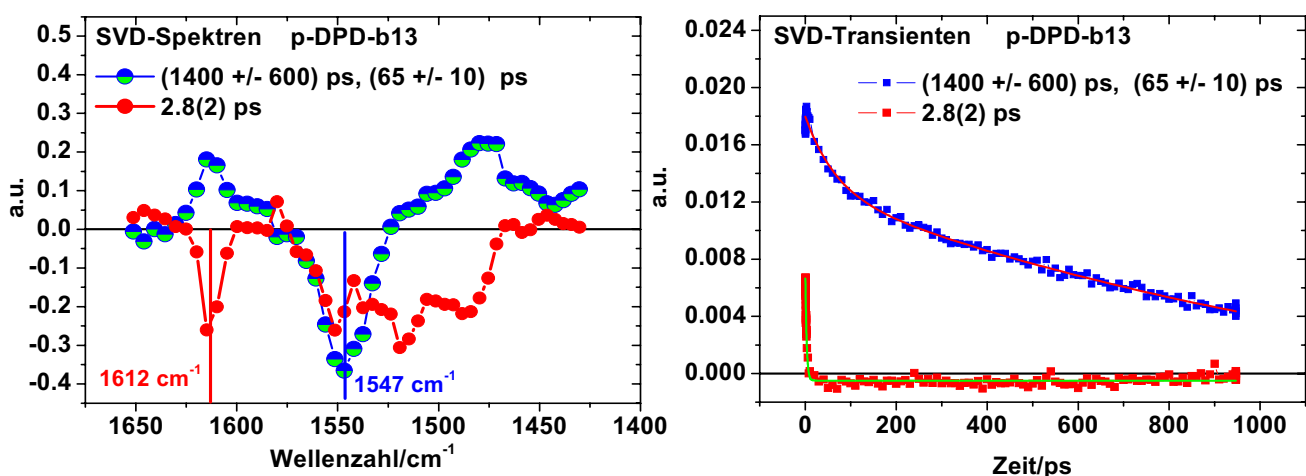
Die Messungen an p-DPD-b13 und an DASPI werden einem globalen Fit unterzogen. Abb. 4.83 zeigt den globalen Fit über dem gemessenen Spektralbereich für



**Abbildung 4.83:** p-DPD-b13: GF-Spektren. Der GF wurde in zwei spektralen Bereichen durchgeführt, die sich bei  $\sim 1525 \text{ cm}^{-1}$  überschneiden.

<sup>1</sup> Die Absorptionsfrequenz der symmetrischen C=C-Streckschwingung bei einem dem DASPI sehr ähnlichen Farbstoff liegt nach einer Normalmodenberechnung bei  $1595 \text{ cm}^{-1}$  [Okamoto1999].

p-DPD-b13. Der GF wurde mit drei Zeitkonstanten in zwei spektral breiten Frequenzbereichen durchgeführt. Der GF musste derart aufgeteilt werden, da die Fitroutine einen Fit über alle Transienten aufgrund eingeschränkter Parameterzahl nicht zulässt. Im Überschneidungsbereich bei  $\sim 1525 \text{ cm}^{-1}$  zeigen die globalen Fits aus den zwei Bereichen sehr gute Übereinstimmung. Die Dynamik wird durch die Zeitkonstanten 2.4(2) ps, 30(2) ps, (791  $\pm$  45) ps bzw. 33(2) ps, 2.0(2) ps und (1105  $\pm$  100) ps bestimmt. Die Entstehung des Photoproduktes bei  $1611 \text{ cm}^{-1}$  geschieht mit 2.4 ps (vgl. 2.4 ps-Spektrum aus Abb. 4.83). Die spektral breite Produktbande zerfällt mit den zwei Zeitkonstanten 30 ps und 791 ps: Das GF-Spektrum der 30 ps-Zeitkomponente hat bei  $1604 \text{ cm}^{-1}$  die Form einer Absorptionsbande, und das 791 ps-GF-Spektrum bei  $1614 \text{ cm}^{-1}$  sein Maximum. Der Rückgang der Bleichbande bei  $1548 \text{ cm}^{-1}$  läuft ebenfalls mit den zwei Zeitkonstanten 30 ps und 791 ps ab. Die GF-Spektren dieser Zeitkonstanten haben bei  $1550 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1547 \text{ cm}^{-1}$  die Form einer (invertierten) Absorptionsbande. Die SVD-Analyse in diesem Bereich führt zu analogen Ergebnissen wie der GF. In Abb. 4.84 ist das Ergebnis der SVD-Analyse für p-DPD-b13 dargestellt. Zum signifikantesten Spektrum gehört eine SVD-Transiente, die biexponentiell mit 1400 ps und 65 ps zerfällt. Die SVD-Transiente des zweit-relevantesten SVD-Spektrums zerfällt monoexponentiell mit 2.8 ps. Dass die SVD-Transiente des signifikantesten SVD-Spektrums biexponentiell zerfällt, ließe sich mit der in Kapitel 4.1.2.3 beschriebenen „SVD-Subsummierung“ erklären: Die GF-Spektren der 30 ps (bzw. 33 ps)- und der 791 ps (bzw. 1105 ps)-Zeitkomponente weisen einen nahezu parallelen Verlauf auf.



**Abbildung 4.84:** p-DPD-b13: SVD-Spektren (links) und SVD-Transienten (rechts). Die zu dem signifikantesten SVD-Spektrum gehörige Transiente zerfällt biexponentiell mit 1400 ps und 65 ps. Hier scheint es zu der in Kapitel 4.1.2.3 beschriebenen „SVD-Subsummierung“ gekommen zu sein.

In der SVD-Analyse kann daher nur ein SVD-Spektrum für beide Zeitkonstanten gefunden werden. GF und SVD bestätigen sich gegenseitig ihre Ergebnisse, denn es wird die gleiche Anzahl von Zeitkonstanten gefunden, die verträglich oder innerhalb ihrer Fehler gleich sind. Der Verlauf der entsprechenden SVD- und GF-Spektren weist viele Ähnlichkeiten auf. Der Ansatz, die Transienten mit drei Exponentialfunktionen zu fitten, erscheint daher gerechtfertigt.

Abb. 4.85 gibt den GF und die SVD der Messungen an DASPI wieder. Die SVD und der GF stimmen in Anzahl und Größe der gefundenen Zeitkonstanten überein (Verträglichkeit zwischen 28(2) ps und 23(1) ps). Der systematische Verlauf sich entsprechender Spektren ist auch vergleichbar. Der Ansatz des GF mit drei Zeitkonstanten ist daher gerechtfertigt (23(1) ps, 7.1(6) ps und 0.7(1) ps). Bei 1594  $\text{cm}^{-1}$  hat das 23 ps-GF-Spektrum ein Minimum, das die Form einer Absorptionsbande hat: Der Rückgang der Bleichbande bei 1594  $\text{cm}^{-1}$  geschieht mit einer Zeitkonstante von 23(1) ps. Bei 1610  $\text{cm}^{-1}$  ist ein Minimum der 0.7 ps-Komponente in Form einer Bande: Das Produkt bei 1608  $\text{cm}^{-1}$  entsteht mit einer Zeitkonstante von 0.7(1) ps. Der Verlauf des 23 ps-GF-Spektrum bei

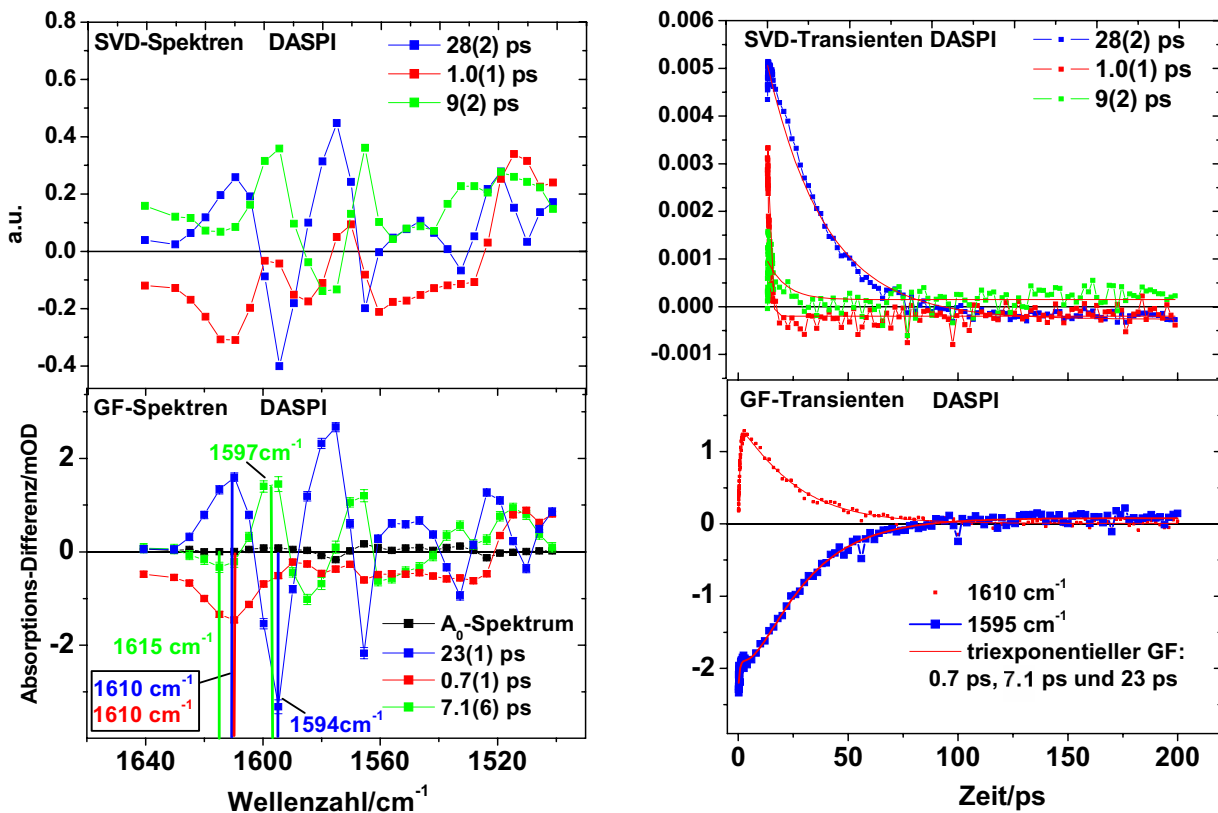


Abbildung 4.85: DASPI: GF-Spektren (unten) und SVD (oben).

1610  $\text{cm}^{-1}$  in Form einer Absorptionsbande zeigt, dass das Produkt wieder mit 23(1) ps zerfällt. Produktzerfall und Bleichbandenrückgang entsprechen sich also. Das GF-Spektrum der 7.1 ps-Komponente hat ein Minimum bei 1615  $\text{cm}^{-1}$  und ein Maximum bei 1597  $\text{cm}^{-1}$  jeweils in Form einer Absorptionsbande.

#### 4.5.1.3 Analyse und Diskussion

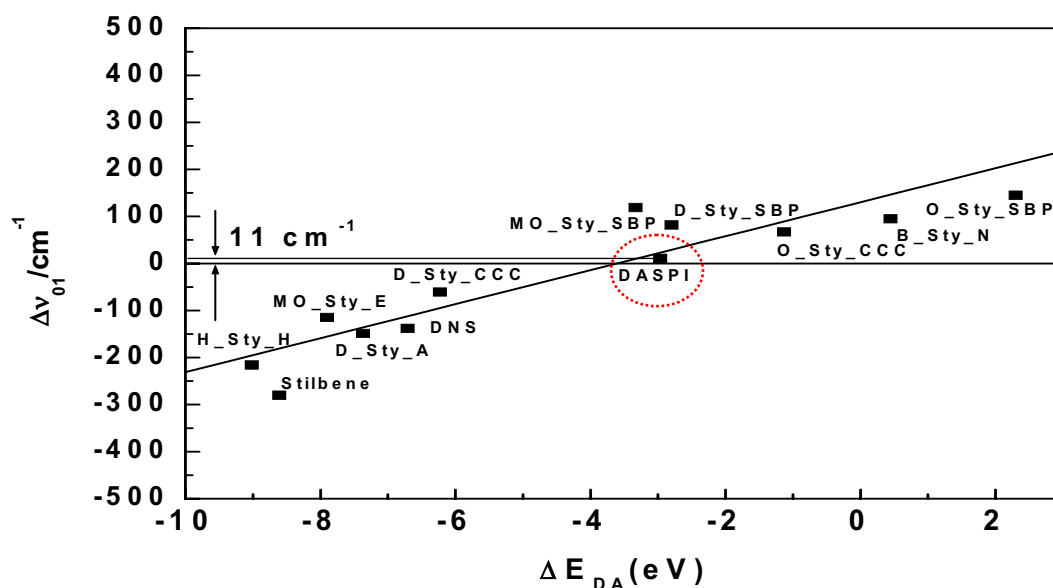
Neuere theoretische Betrachtungen für eine Serie von Polyenen und aromatischen Polyenen (Styren- und Stilben-Derivate) mit Donor- und Akzeptor-Substituenten, welche die Polarisation des  $\pi$ -Elektronensystem erhöhen, haben gezeigt, dass nach Photoanregung strukturelle Details, wie etwa alternierende Einfach- und Doppelbindungen beeinflusst werden [Rettig2003]. Auch entscheidet sich, welche Bindung im elektronisch angeregten Zustand bei der Isomerisierung bevorzugt involviert ist. Eine Schlüsselfunktion nimmt dabei das Cyanin-Limit (CL) ein, welches bei Polarisierungen auftritt, bei der die Wellenfunktionen vom Grund- und elektronisch angeregtem Zustand gleiche Anteile an den drei limitierenden Resonanzstrukturen, aromatischer, polyenischer und chinoider Zustand, haben [Dähne1990][Förster1939]. Am CL ändert sich der Charakter einer gegebenen Doppel- oder Einfachbindung nach Photoanregung nicht und damit auch nicht die Schwingungsfrequenz einer Streckschwingungsmode mit Doppelbindungscharakter (C=C-Streckschwingung). Bis zu einer bestimmten Polarisation des  $\pi$ -Elektronensystems, die abhängig von den Substituenten ist, wird die Schwingungsfrequenz der Streckschwingungsmode im  $S_1$  gegenüber dem  $S_0$  verkleinert. Am CL schließlich sind die Schwingungsfrequenzen für Grund- und elektronisch angeregtem Zustand gleich. Wird das CL durch noch stärkere Polarisierungen des  $\pi$ -Elektronensystems schließlich überschritten, so erhöht sich die Schwingungsfrequenz der Streckschwingungsmode im  $S_1$ . DASPI ist ein derart hoch-polarisiertes Stilben-Derivat. Bei DASPI wurde in unseren Experimenten beobachtet, dass es zu einer Frequenzerhöhung der C=C-Streckschwingung im elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  gegenüber dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  von + 13(2)  $\text{cm}^{-1}$  kommt (siehe Abb. 4.82).

Für eine Reihe von Stilben- und Styren-Derivaten mit verschiedenen Donor-Akzeptor-Substituenten wurde die AM1-Methode [Dewar1985] mit dem AMPC-Programmpaket [AMPAC1997] benutzt, um quantenchemische Daten, wie etwa geometrische Parameter des vollständig optimierten Grundzustandes (ohne Konfigurations-



wechselwirkung, CL) und des ersten elektronisch angeregten Zustandes (mit Konfigurationswechselwirkung, CL) zu berechnen. [El-Gezawy2004/I][El-Gezawy2004/II]. Das CL beinhaltet dabei 300-400 einfache und mehrfach angeregte Konfigurationen auf der Basis von acht zentralen Molekülorbitalen. Die Anwendbarkeit der AM1-Methode wurde intensiv für diesen Typ von Molekül getestet [Gorse1996][Gorse1995][Gedeck1997][Gedeck1999]. Die Energiedifferenz zwischen dem HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) des Donator (D)-enthaltenden Moleküls und dem LUMO (Lowest Un-Occupied Molecular Orbital) des Akzeptor (A)-enthaltenden Moleküls wird verwendet als ein Maß für die Donor-Akzeptorstärke und als Donor-Akzeptor-Differenz,  $\Delta E_{DA}$ , bezeichnet.

Wir wollen nun die gemessenen mit den theoretisch berechneten Bandenverschiebungen vergleichen. In Abb. 4.86 ist die berechnete Frequenzverschiebung für Grund- und elektronisch angeregten Zustand für eine Doppelbindungs-Streckschwingungsmode als eine Funktion des substituenten-induzierten Feldes (quantifizierbar mit  $\Delta E_{DA}$ ) für eine Serie von Styren- und Stilben-Derivaten gezeigt. Die Abhängigkeit der Frequenzverschiebung  $\Delta \nu_{01}$  von  $\Delta E_{DA}$  ist linear, auch oberhalb des CL.

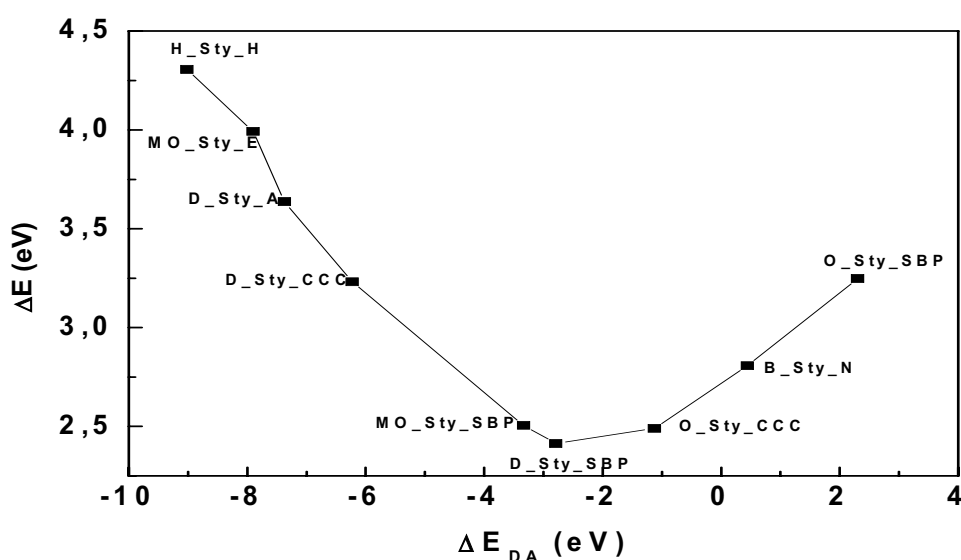


**Abbildung 4.86:** Berechnete Frequenzverschiebung  $\Delta \nu_{01}$  für Grund- und elektronisch angeregten Zustand für eine Doppelbindungs-Streckschwingungsmode als Funktion von  $\Delta E_{DA}$  für verschiedene Styren- und Stilben-Derivate [El-Gezawy2004/I][El-Gezawy2004/II].

Für DASPI wurde eine theoretische Verschiebung der Frequenz für eine Streckschwingungsmode von  $+11 \text{ cm}^{-1}$  berechnet. Das liegt nahe am gemessenen Wert von

+ 13(2) cm<sup>-1</sup> (Abb. 4.82). Für p-DPD-b13 kam es ebenfalls zu einer gemessenen Frequenzerhöhung von + 64 cm<sup>-1</sup> (Abb. 4.81). Hierfür existieren noch keine theoretischen Berechnungen. Die Frequenzerhöhung bei DASPI und bei p-DPD-b13 zeigt, dass die zentrale Doppelbindung noch stärkeren Doppelbindungscharakter im elektronisch angeregten Zustand erhält. Der Grundzustand von DASPI hat daher einen größeren Anteil an der chinoiden Resonanzstruktur A (Abb. 4.88/links). Im elektronisch angeregten Zustand hingegen ist die aromatische Resonanzstruktur B erhöht<sup>1</sup>.

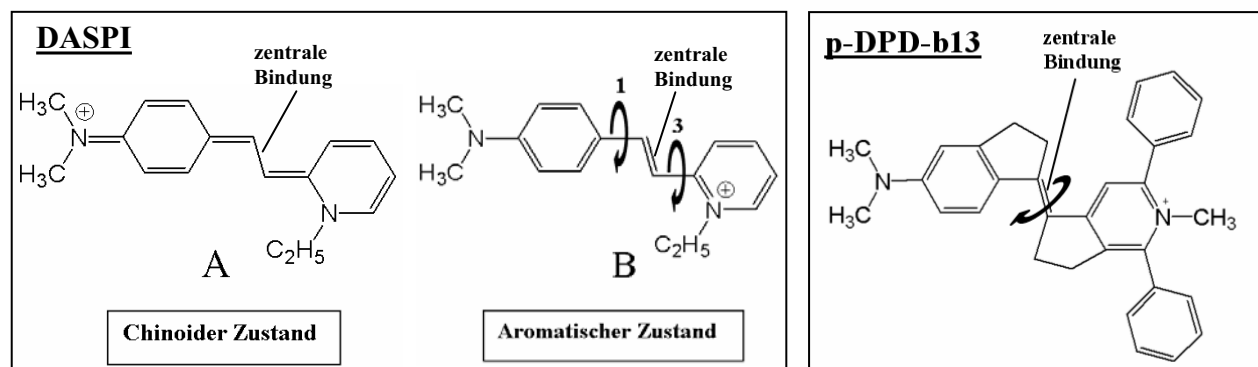
Die Position des CL wurde unabhängig durch Berechnung der Energiedifferenz zwischen S<sub>0</sub> und S<sub>1</sub> bestimmt. Dabei ist gerade am CL ein Minimum in der Energielücke. Abb. 4.87 gibt die berechnete Energielücke zwischen S<sub>0</sub> und S<sub>1</sub> als eine Funktion von  $\Delta E_{DA}$  für eine Reihe von Styren-Derivaten wieder.



**Abbildung 4.87:** Berechnete Energiedifferenz zwischen S<sub>0</sub> und S<sub>1</sub> in Abhängigkeit von  $\Delta E_{DA}$  für verschiedene Styren-Derivate [El-Gezawy2004/I][El-Gezawy2004/II].

In Tabelle 4.3 sind die beobachteten Frequenzen für die C=C-Streckschwingung für S<sub>0</sub> und S<sub>1</sub> und die Verschiebungen im Vergleich zu den berechneten Daten und Literaturdaten dargestellt.

<sup>1</sup> Damit ist ein bestimmter Beitrag einer Resonanzstruktur an dem Realzustand gemeint. Eine einzelne Resonanzstruktur beschreibt nicht den realen Bindungszustand. Der reale Bindungszustand ist eine Mischform (Resonanzhybrid) von Resonanzstrukturen.



**Abbildung 4.88:** links: Die beiden Resonanzstrukturen von DASPI: Chinoider Zustand A, aromatischer Zustand B [El-Gezawy2004/I][El-Gezawy2004/II]. Rechts: p-DPD-b13.

Compound	$\nu(S_0)_{\text{exp}} (\text{cm}^{-1})$	$\nu(S_1)_{\text{exp}} (\text{cm}^{-1})$	$\Delta\nu_{\text{exp}} (\text{cm}^{-1})$	$\Delta\nu_{\text{cal}} (\text{cm}^{-1})$
Stilben	1596 <sup>a)</sup>	1570 <sup>a)</sup>	-26	-280
DNS	1624 <sup>b)</sup>	1622 <sup>b)</sup>	-2	-138
DASPI	1594(1)	1607(2)	+13(2)	+11
p-DPD-b13	1548	1612	+64	----

**Tabelle 4.3:** Beobachtete Frequenzen für die C=C-Streckschwingung in  $S_0$  und  $S_1$  und deren Verschiebung [El-Gezawy2004/I][El-Gezawy2004/II]. <sup>a)</sup>[Okamoto1999]; <sup>b)</sup>[Okamoto1996]

Unsere Messungen mittels transientser IR-Schwingungsspektroskopie haben zum ersten Mal gezeigt, dass es bei hoch-polarisierten Donor-Akzeptor-Stilbenen zu einer Frequenzerhöhung der C=C-Streckschwingung beim Übergang  $S_0 \rightarrow S_1$  kommt. Diese Frequenzerhöhung wird durch die stärker vertretene aromatische Resonanzstruktur im  $S_1$  bewirkt.

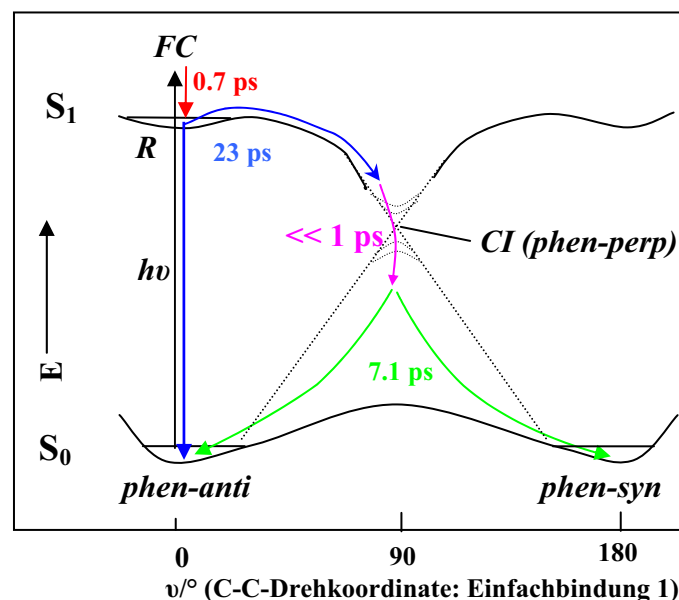
Die Ergebnisse der Messungen an den Farbstoffen können eine Grundlage sein, um für bR, HR oder andere Retinalproteine den Opsinshift zu berechnen und den Isomerisierungsmechanismus herzuleiten [Liu1985][Liu2000][Liu2001][Sczapan2003] (vgl. Kapitel 2.3).

### Mögliche Reaktionsschemata für DASPI und p-DPD-b13

Um einen Ansatz zur Interpretation für die Dynamik von DASPI zu bekommen, schauen wir uns ein mögliches Potentialschema in Abb. 4.89 an. Dieses Potentialschema leitet sich von einem Schema für DPD ab [Sczapan2001]. Bei DPD findet die Drehung um die zentralen Einfachbindungen statt. Auch DASPI führt nach Photoanregung eine Torsion um die Einfachbindungen aus. Dabei wird die Drehung des symmetrischen Phenylringes um die Einfachbindung 1 (Abb. 4.88/links/B) der dominante Prozess im  $S_1$  sein, da in stark polaren

Lösungsmitteln, wie Acetonitril-d<sub>3</sub>, die Potentialschwelle für eine Drehung um 90° sehr klein wird [Strehmel1997][Kim1999][VanderMeer2000]<sup>1</sup>. Eine Drehung des Pyridiniumringes um die Einfachbindung 3 ist dagegen unwahrscheinlich, da die Potentialbarriere dafür höher als die thermische Energie bei Raumtemperatur ist [Kim1999]<sup>2</sup>. Der Franck-Condon-Zustand zerfällt innerhalb von 0.7 ps in den strukturell relaxierten Zustand „R“ (Bindungslängenrelaxation)<sup>3</sup> (Abb. 4.89). In R liegt der Farbstoff noch in *anti*-Konfiguration (Drehwinkel  $\nu = 0^\circ$ ) vor. „R“ zerfällt innerhalb von 23 ps: DASPI dreht sich dabei um die Einfachbindung 1 um ca. 90° (*CI (phen-perp)*)<sup>4</sup>. Das System geht durch die konische Durchschneidung „CI“ und erreicht in 7.1 ps wieder das *phen-anti*- und *phen-syn*-Rotamer im S<sub>0</sub><sup>5</sup>.

### DASPI



**Abbildung 4.89:** Potentialschema zur Photoreaktion von DASPI. Mit eingetragen sind die Zeiten aus dem globalen Fit von DASPI. Die Reaktionskoordinate ist der Drehwinkel der Phenylgruppe um die Einfachbindung 1 (vgl. Abb. 4.88/links/B). Senkrecht zur C-C-Drehkoordinate liegt eine Relaxationskoordinate (Bindungslängen). Über diese Koordinate (evtl. noch über weitere) erfolgt die Annäherung vom S<sub>1</sub> an den S<sub>0</sub>. Der Übergang zum S<sub>0</sub> verläuft durch die konische Durchschneidung (CI).

<sup>1</sup> Das zu DASPI ähnliche Stilben-Derivat DS dreht sich fast nur um die Einfachbindung 1 (Abb. 4.88/links/B) [Letard1994]. Das zu DASPI isoelektronische DPD dreht sich ebenfalls vorzugsweise um die Einfachbindung 1 [VanderMeer2000].

<sup>2</sup> Die Potentialbarriere wurde berechnet, es gibt jedoch keine experimentelle Bestätigung hierfür. Eine Drehung um die zentrale Doppelbindung kann in stark polaren Lösungsmitteln ausgeschlossen werden, da keine Photoisomere beobachtet werden [Kim1999].

<sup>3</sup> Jonkman et al. fanden eine initiale Fluoreszenzdynamik für DASPI in Acetonitril von 0.8(1) ps [Jonkman1996]. Dieser Zeit ordnen Jonkman et al. Reorientierungs- und Translationsbewegungen der Lösungsmittelmoleküle zu.

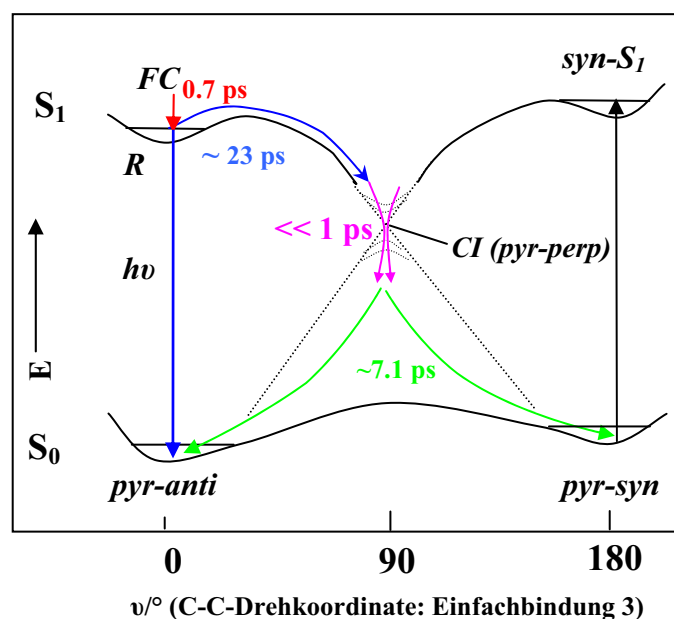
<sup>4</sup> Van der Meer et al. haben eine S<sub>1</sub>-Lebensdauer für DASPI in Acetonitril von 21 ps gemessen [VanderMeer2000].

<sup>5</sup> Abb. 4.88/links/B: Bei 180°-Drehung der symmetrischen Phenylgruppe um die Einfachbindung 1 sind „*phen-syn*“ und „*phen-anti*“ identische Moleküle („*phen-syn*“ = „*phen-anti*“). Der eigentliche Durchgang über die CI erfolgt ultraschnell (<< 1 ps). Zwischen der CI und dem S<sub>0</sub> geschieht dann die Drehung um die C-C-Einfachbindung 1 in 7.1 ps.

Die GF- Spektren von DASPI (siehe Abb. 4.85) wären mit einem derartigen Potentialschema zu erklären: Bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  haben die GF-Spektren der 0.7 ps und der 23 ps-Zeitkomponente gerade die Form von Absorptionsbanden (Abb. 4.85). Hier beobachtet man die Entstehung des *R*-Zustandes im  $S_1$  mit 0.7 ps. Dieser Zustand zerfällt innerhalb von 23 ps. Die Rückbildung der Bleichbande bei  $1594\text{ cm}^{-1}$  geschieht mit zwei Zeitkonstanten, 7.1 ps (positive Amplitude) und 23 ps (negative Amplitude) (Abb. 4.85): Das entspricht einer Folgereaktion erster Ordnung (Reaktionsschema von Abb. 4.89), bei der die Amplitude für die kürzere Zeitkonstante, bzw. für die größere Rate immer positiv ist.

Alternativ hierzu wäre noch ein weiteres Reaktionsschema für DASPI denkbar. Dabei geht man davon aus, dass DASPI um die Einfachbindung 3 (Abb 4.88/links/B) drehen kann (Drehung der unsymmetrischen Pyridiniumgruppe). Der Grundzustand wird dadurch heterogen. Es entsteht also ein dynamisches, photoinduziertes Gleichgewicht zwischen zwei verschiedenen Konformeren im Grundzustand, wobei das eine um  $180^\circ$  um die Einfachbindung 3 gedreht ist. Dieses Konformer bezeichne ich als „*pyr-syn*“. Das andere Grundzustandskonformer sei um diese Einfachbindung nicht gedreht und mit „*pyr-anti*“ bezeichnet. In unseren statischen IR- Transmissionsspektren von DASPI (nicht abgebildet) zeigen sich Banden bei etwa  $1595\text{ cm}^{-1}$  und  $1565\text{ cm}^{-1}$ . In den IR- Differenz-

### DASPI



**Abbildung 4.90:** Alternatives Potentialschema zur Photoreaktion von DASPI. Die Reaktionskoordinate ist der Drehwinkel der Pyridiniumgruppe um die Einfachbindung 3 (vgl. Abb. 4.88/links/B). senkrecht zur C-C-Drehkoordinate liegt wieder die Bindungslängen-Relaxationskoordinate. Zusätzliche Drehungen um die Einfachbindung 1 werden in Anhang/Primärreaktion DASPI behandelt.

spektren aus Abb. 4.82 sind an diesen Stellen gerade Bleichbanden<sup>1</sup>. Dem Zustand *pyr-anti* könnte man die Bleichbande bei 1594 cm<sup>-1</sup> und dem *pyr-syn*-Zustand die Bleichbande bei 1565 cm<sup>-1</sup> zuordnen. Abb. 4.90 zeigt das alternative Potentialschema zur Photoreaktion von DASPI. Die Reaktionskoordinate ist der Drehwinkel um die Einfachbindung 3 (Abb. 4.88/links/B). Die unterschiedlichen Vorzeichen des 7.1 ps-GF-Spektrums (positiv) und des 23 ps-GF-Spektrums (negativ) an der Position der zuletzt genannten Bleichbanden (Abb. 4.85) erfordert eine sequentielle Reaktion. Die *pyr-anti*-Spezies durchläuft einen zur „*anti*“-Spezies (Abb. 4.89) analogen Photozyklus. Die *pyr-syn*-Spezies hingegen wird in den Zustand *syn-S<sub>1</sub>* angeregt, der ebenfalls mit etwa 23 ps zerfällt. Nachdem das System die konische Durchschneidung *CI* (*pyr-perp*) passiert hat, findet eine weitere Drehung innerhalb von 7.1 ps um die Einfachbindung 3 statt: Die Spezies *pyr-anti* und *pyr-syn* werden wieder erreicht. Dieses Reaktionsschema ist konsistent mit den GF-Spektren aus Abb. 4.85. Es erklärt das unterschiedliche Vorzeichen der 7.1 ps- und 23 ps-GF-Spektren im Bereich der Bleichbanden bei 1594 cm<sup>-1</sup> und 1565 cm<sup>-1</sup> (sequentielle Reaktion). Ordnet man nun noch der Produktbande bei 1607 cm<sup>-1</sup> (s. Abb. 4.82) die *S<sub>1</sub>*-Spezies *R* aus dem *pyr-anti*-Zweig, und der Produktbande bei 1574 cm<sup>-1</sup> die *syn-S<sub>1</sub>*-Spezies aus dem *pyr-syn*-Zweig zu, so erklärt sich auch die Dynamik in den Produktbanden mit dem alternativen Reaktionsschema aus Abb. 4.90. Das Produkt *R* entsteht mit 0.7 ps und zerfällt mit 23 ps, was der Dynamik der 0.7 ps-GF- und 23 ps-GF-Spektren bei 1610 cm<sup>-1</sup> entspricht (Abb. 4.85, identischer Betrag der Amplituden der GF-Spektren). Die Produktbande bei 1574 cm<sup>-1</sup> ist nahezu instantan vorhanden (Abb. 4.82) und zerfällt mit 23 ps (23-ps-GF-Spektrum in Abb. 4.85). Das korrespondiert genau mit dem Verhalten der *syn-S<sub>1</sub>*-Spezies (Abb. 4.90).

Für DPD-Formen ist bekannt, dass es durch Überbrückung von Einzelbindungen wie beim p-DPD-b13 zu einer Verlängerung der Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes kommt [VanDerMeer2000]. Sind die Einfachbindungen beim DPD nicht überbrückt, so resultiert ein verstärkter, strahlungsloser Zerfall des *S<sub>1</sub>*, der sich aus der Flexibilität<sup>2</sup> (Torsion

---

<sup>1</sup> Ein thermisches Gleichgewicht zwischen den Zuständen *pyr-syn* und *pyr-anti* wäre denkbar (Banden bei 1595 cm<sup>-1</sup> und 1565 cm<sup>-1</sup> im statischen IR-Transmissionsspektrum). Die Barriere im *S<sub>0</sub>* wird zur Zeit von Rettig et al. berechnet.

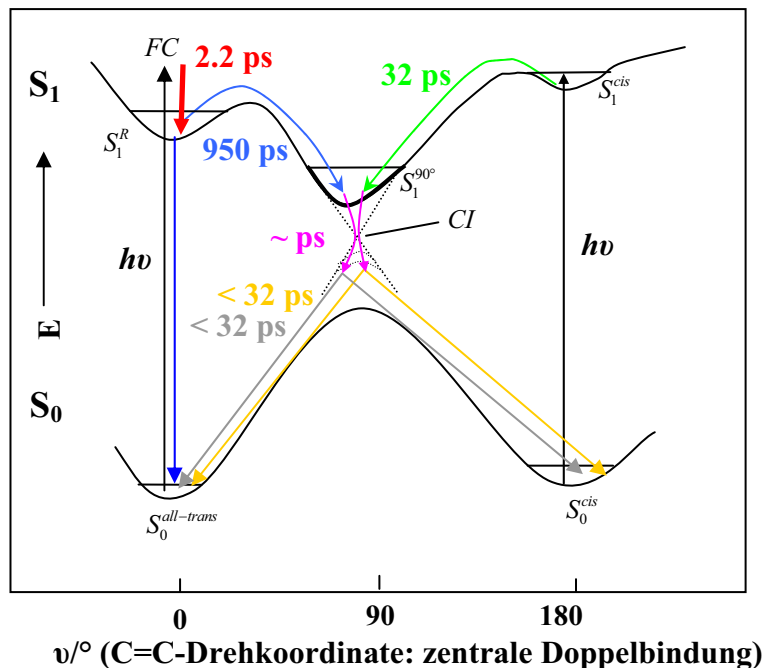
<sup>2</sup> Das Verhalten des Stilben-Derivates DCS zu DCS-b13 ist völlig anders als zwischen p-DPD und p-DPD-b13. Bei DCS-b13 wird eine um zwei Zehnerpotenzen abgeschwächte Fluoreszenz im Vergleich zu DCS beobachtet, was mit einem verstärkten nicht-strahlenden Zerfall verbunden ist (Drehung um Doppelbindung) [Lapouyade1992] [Rettig2001]. Der Grund hierfür ist, dass beim DCS-b13 durch die Überbrückung der zentralen Einfachbindungen ein Reaktionskanal geschlossen wurde, über den DCS sonst stark fluoresziert. Für p-DPD hingegen ist dieser zuletzt erwähnte Reaktionskanal mit einem nicht-strahlenden Zerfall verknüpft. Schließt man diesen beim p-DPD-b13, so wird die Fluoreszenz erhöht.

und Biegung) von funktionellen Gruppen ergibt, die über eine Einfachbindung mit dem Rest des Moleküls verbunden sind. Die Anwesenheit von diesen flexiblen Gruppen kann zu einer vergrößerten Kopplung zwischen dem angeregten Zustand und der hohen Mannigfaltigkeit von Schwingungszuständen des Grundzustandes führen, was den strahlungslosen Übergang von  $S_1$  nach  $S_0$  begünstigt („loose bolt-Theorie“ [Lewis1939]). Bei den überbrückten DPD-Formen wird dieser Übergang hingegen unterdrückt, was zu der Verlangsamung des Zerfalls des  $S_1$  führt. Die Bewegung der flexiblen Gruppen hängt auch von der Viskosität des Lösungsmittels ab. Ist die Viskosität hoch, so verlangsamen sich die Torsions- und Biegebewegungen. Dadurch wird die Rate des strahlungslosen Prozesses verkleinert. Rettig et al. ermittelten für in Acetonitril-d<sub>3</sub> gelöstes p-DPD-b13 eine Lebensdauer für den  $S_1$ -Zustand von 1420 ps (Fluoreszenzmessung). In unseren Experimenten war das Lösungsmittel ebenfalls Acetonitril-d<sub>3</sub>, und wir fanden eine Lebensdauer von  $t \geq 950$  ps (Mittelwert aus GF). Die kürzeste Zeit, die mit dem GF gefunden wurde lag bei  $\sim 2.2$  ps (Mittelwert aus GF). Dieser Zeit ließen sich molekulare Relaxationsprozesse (Bindungslängenrelaxation) zuordnen. Eine neuere Beschreibung des strahlungslosen Zerfalls des  $S_1$  ist der Durchgang über eine konische Durchschneidung [Becker1991].

Die GF-Spektren des p-DPD-b13 in Abb. 4.83 sprechen dafür, dass der Rückgang des Ausgangszustandes über zwei Zeitkonstanten,  $\sim 32$  ps und  $\sim 950$  ps, geschieht. Für den nicht-überbrückten Farbstoff p-DPD und DASPI wird angenommen, dass es verschiedene Relaxationskanäle gibt, über die die Anregungsenergie nach und nach dissipiert [Sczegan2001]. Nach Anregung in den Frank-Condon-Zustand (FC) erfolgt eine schnelle, strukturelle Relaxation ( $\sim 5$  ps), die zu einer Änderung von C-C-Einfach- und C=C-Doppelbindungslängen führt und somit den polymethinischen Charakter dieser Verbindungen bestimmt [Rettig2001]. Bei Raumtemperatur gibt es zwei Zeitdomänen der Relaxation, wobei die Drehung um C-C-Einfach- bzw. C=C-Doppelbindungen<sup>1</sup> der langsamere Prozess ( $\sim 1000$  ps) ist. Theoretische Berechnungen für polymethinartige Farbstoffe unterstützen diese Annahme der zweistufigen Relaxation [Garavelli1998]. Die erste Stufe ist mit einer Änderung von Bindungslängen verbunden, die zweite mit einer Drehung um diese Bindungen. Die Anregungsenergie wird zum Teil umgewandelt über einen nicht-strahlenden Zerfall durch eine Drehung über die C-C-Einfachbindungen um  $90^\circ$ . Das um  $90^\circ$  gedrehte Molekül zerfällt strahlungslos zum Ausgangszustand. Eine weitere Möglichkeit, die nur für die doppelt überbrückten Farbstoffe wie p-DPD-b13 beobachtet

<sup>1</sup> Die Drehung um die C=C-Doppelbindung spielt nur eine geringe Rolle, da die Rate für diese Drehung klein ist.

**p-DPD-b13**



**Abbildung 4.91:** Potentialschema zur Photoreaktion von p-DPD-b13. Senkrecht zur C=C-Drehkoordinate liegt eine Bindungslängen-Relaxationskoordinate, über die die konische Durchschneidung (CI) zwischen  $S_1$  und  $S_0$  besteht.

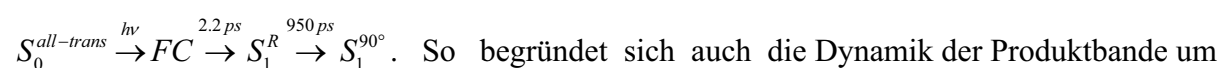
wurde, ist eine Drehung um  $90^\circ$  über die zentrale C=C-Doppelbindung (Abb. 4.88/rechts) ( $S_1^{90^\circ}$ ) gefolgt von einem strahlungslosen Zerfall zum Ausgangszustand ( $S_0^{all-trans}$ ), der in all-trans-Konfiguration vorliegt, oder über eine weitergehende Drehung zu einem Isomer  $S_0^{cis}$ , das die cis-Konfiguration aufweist (um  $180^\circ$  gedreht). Es gibt noch einen dritten Relaxationsprozess des strukturell relaxierten Zustandes, der mit  $S_1^R$  bezeichnet werden soll. Über direkte, interne Konversion zerfällt  $S_1^R$  wieder zum Ausgangszustand [Velsko1998]<sup>1</sup>. Dieses für p-DPD-b13 skizzierte Reaktionsmodell basiert auf einem Reaktionsschema, das von Sczegan et al. für doppelt überbrückte Stilbazolium-Farbstoffe, wie dem p-DPD-b13, entwickelt wurde [Sczegan2001]. Unsere Messungen an p-DPD-b13 stützen dieses Reaktionsmodell unter der Annahme eines dynamischen, photoinduzierten Gleichgewichtes zwischen den Konzentrationen der  $S_0$ -Zustände  $S_0^{all-trans}$  und  $S_0^{cis}$  [Simeonov2000]. In Abb. 4.91 ist ein mögliches Potentialschema zur Photoreaktion von p-DPD-b13 dargestellt. Die Reaktionskoordinate ist der Drehwinkel um die zentrale C=C-Doppelbindung des p-DPD-b13 (Abb. 4.88/rechts). Beide  $S_0$ -Zustände werden durch den Pumpimpuls angeregt (Abb. 4.91).

<sup>1</sup> Velsko et al. interpretieren den Zerfall von  $S_1^R$  über eine konische Durchschneidung als interne Konversion [Velsko1998].



$S_0^{cis}$  wird in den  $S_1$ -Zustand  $S_1^{cis}$  angeregt, der in 32 ps in den Zustand  $S_1^{90^\circ}$  zerfällt. Der Zustand  $S_1^{90^\circ}$  entsteht jedoch auch nach Anregung des Grundzustandes  $S_0^{all-trans}$ ; er bildet sich also aus zwei verschiedenen Reaktionszweigen. Dem Teil von  $S_1^{90^\circ}$ , der aus dem „ $S_0^{all-trans}$ -Zweig“ stammt, ist die lange Zeitkomponente von 950 ps „aufgeprägt“, d. h. die Dynamik der Wiederkehr des  $S_0^{all-trans}$ -Zustandes hat eine langsame Zeitkomponente von 950 ps. Der Teil von  $S_1^{90^\circ}$ , der aus dem „ $S_0^{cis}$ -Zweig“ stammt, ist von der langen Zeitkomponente 950 ps „entkoppelt“. Beide  $S_1^{90^\circ}$ -Teile zerfallen mit einer Zeit, die deutlich kleiner als 32 ps ist <sup>1</sup>, nach  $S_0^{all-trans}$  und nach  $S_0^{cis}$  (gelbe und graue Pfeile). Die Dynamik des Bleichbandenrückganges bzw. der Wiederkehr des Ausgangszustandes  $S_0^{all-trans}$  ist somit also auch durch die Zeitkonstante 32 ps bestimmt <sup>2</sup>.

Die GF-Spektren aus Abb. 4.83 können so interpretiert werden, dass wir mit der kurzen Zeit von ~ 2.2 ps (Mittelwert) die Entstehung des strukturell relaxierten Zustandes  $S_1^R$  beobachten.  $S_1^R$  zerfällt dann mit einer Zeitkonstante von ~ 950 ps zum einen in den Ausgangszustand  $S_0^{all-trans}$  und zum anderen in ein Intermediat  $S_1^{90^\circ}$ , das um die zentrale C=C-Doppelbindung um 90° gedreht ist. Nach  $S_1^{90^\circ}$  erreicht das System in einigen ps die konische Durchschneidung (CI) und zerfällt dann mit einer Zeitkonstante von < 32 ps zurück zum Ausgangszustand  $S_0^{all-trans}$  (- 90° Drehung) und zum cis-Isomer  $S_0^{cis}$  (+ 90° Drehung). Der Rückgang der Bleichbande und die Entstehung der Produktbanden bei 1610 cm<sup>-1</sup> und bei 1477 cm<sup>-1</sup> können mit diesem Reaktionsschema gut erklärt werden. Die Produktbande bei 1610 cm<sup>-1</sup> bildet sich gemäß dem GF aus Abb. 4.83 innerhalb von 2.2 ps und zerfällt mit 950 ps (jeweils Mittelwerte der kurzen und langen Zeitkonstanten). Das entspricht der Entstehung und dem Zerfall des Produkts  $S_1^R$  in der Teilreaktion des „ $S_0^{all-trans}$ -Zweiges“



<sup>1</sup> Die Zeit muß deutlich kleiner als 32 ps sein, da sonst der Bleichbandenrückgang bei 1548 cm<sup>-1</sup> durch eine längere Zeitkomponente als 32 ps geprägt wäre (s. negative Amplitude des 30 ps-GF-Spektrums bei ~1550 cm<sup>-1</sup> in Abb. 4.83).

<sup>2</sup> In Abb. 4.91 ist der  $S_1^{90^\circ}$ -Zustand deutlich als Minimum eingezeichnet. Die konische Durchschneidung liegt bei Drehung um eine C=C-Doppelbindung (90°) weiter vom gedrehten Zustand entfernt als bei einer Drehung um eine C-C-Einfachbindung (vgl. DASPI, Abb. 4.89) [Wang2004]. Die Zeit zum Erreichen der konischen Durchschneidung kann auf wenige ps abgeschätzt werden und ist nicht direkt beobachtbar.

1477  $\text{cm}^{-1}$ . Zusätzlich zeigt sich hier der Zerfall einer Bande in dem spektral breiten, positiven Bereich des 33(2) ps-GF-Spektrums (Abb. 4.83), die dem Zerfall des  $S_1^{cis}$ -Zustandes aus dem  $S_0^{cis}$ -Zweig zugeordnet werden könnte. Der Zustand  $S_1^{90^\circ}$  kann nicht direkt beobachtet werden, denn er zerfällt viel schneller ( $\sim$  ps) als er entsteht (950 ps bzw. 32 ps), so dass seine Konzentration sehr klein ist. In der positiven Bande bei 1604  $\text{cm}^{-1}$  des 30(2) ps-GF-Spektrums kann sich auch der Zerfall des  $S_1^{cis}$ -Zustandes aus dem  $S_0^{cis}$ -Zweig zeigen. Die Position der Bleichbande des  $S_0^{cis}$ -Zustandes könnte ebenfalls bei 1548  $\text{cm}^{-1}$  liegen (breite Bande).

Bei dem Reaktionsschema für DASPI in Abb. 4.89 gibt es im Prinzip auch zwei Reaktionszweige. Es kann aber nicht zwischen diesen unterschieden werden, da die  $S_0$ -Rotamere „phen-syn“ und „phen-anti“ identisch sind: Durch Drehung der symmetrischen Phenylgruppe um  $180^\circ$  wird „phen-syn“ in „phen-anti“ und umgekehrt übergeführt.

Ein alternatives Reaktionsschema wäre auch für p-DPD-b13 zu diskutieren (Abb. 4.92). In diesem Schema ist der Zustand FC-2 aus dem  $S_0^{cis}$ -Reaktionszweig nur sehr kurzlebig ( $\ll$  1ps). Der Zustand  $S_1^{90^\circ}$  entsteht daher zum Teil sehr schnell aus dem  $S_0^{cis}$ -Zweig.

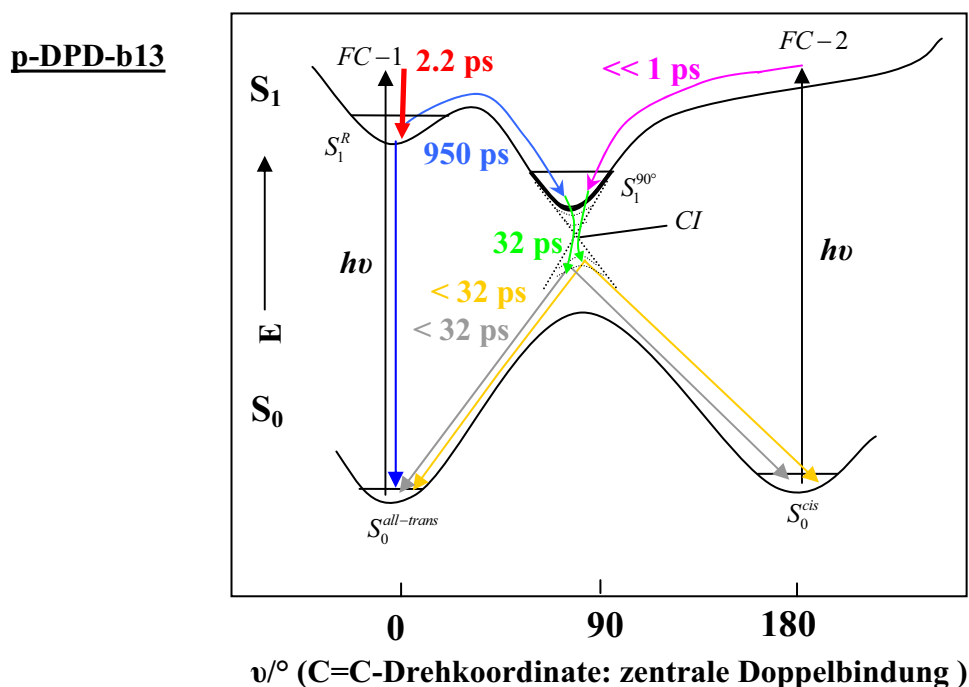


Abbildung 4.92: Alternatives Potentialschema zur Photoreaktion von p-DPD-b13.

heraus.  $S_1^{90^\circ}$  zerfällt innerhalb von 32 ps. Dann ist allerdings die nötige Zeit zum Erreichen der konischen Durchschneidung auf 32 ps abzuschätzen. Die positiven Amplituden des 30 ps-GF- bzw. 33 ps-GF-Spektrums aus Abb. 4.83 wären als Beobachtung des Zerfalls der  $S_1^{90^\circ}$ -Spezies aus dem  $S_0^{cis}$ -Reaktionszweig zu interpretieren. Nachdem das System die konische Durchschneidung passiert hat, findet eine weitere Drehung um die zentrale C=C-Doppelbindung innerhalb von  $< 32$  ps (deutlich kleiner, wahrscheinlich nur einige ps) statt. Die Zeit muß kleiner als 32 ps sein, da sonst der Rückgang der Bleichbande bei  $1548\text{ cm}^{-1}$  neben 950 ps durch eine längere Zeitkonstante als eben diese 32 ps charakterisiert wäre. Für die Dynamik des Rückgangs der Bleichbande ändert sich durch das alternative Reaktionsschema nichts. Zusätzliche Experimente an DASPI und p-DPD-b13 und die theoretische Berechnung von  $S_1$ - und  $S_0$ -Potentialen müssen durchgeführt werden, um die Reaktionsschemata weiter festzulegen.