

2 Die experimentellen Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden zwei Methoden benutzt: zeitaufgelöste Photospannungsmessungen und zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie, die im folgenden nur knapp beschrieben werden, da es sich um etablierte Methoden handelt. Danach wird der experimentelle Aufbau der Doppelblitzapparatur erläutert.

2.1 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Die Abnahme der monochromatischen Lichtintensität beim Durchgang durch eine absorbierende Probe ist proportional zur eingestrahnten Intensität I , der Konzentration c der absorbierenden Spezies, der infinitesimalen Schichtdicke dx und dem für die Spezies charakteristischen Absorptionskoeffizienten $\alpha(\lambda)$:

$$dI = -\alpha(\lambda) c(x) I(x) dx \quad \text{Gl. 2.1}$$

Bei über dem Weg d konstanter Konzentration c läßt sich diese Gleichung zum Lambert-Beer-Gesetz integrieren:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cd} \quad \text{mit } \varepsilon(\lambda) = \frac{\alpha(\lambda)}{\ln 10} \Leftrightarrow A(\lambda) \equiv \varepsilon(\lambda)cd = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad \text{Gl. 2.2}$$

Die Voraussetzung konstanter Konzentration ist bei einer Spezies, die wie bR nach Lichtenregung einen Zyklus in der Zeit τ durchläuft, nur dann erfüllt, wenn die Rate für die Lichtenregung durch das Meßlicht ($k = \sigma \frac{I}{\hbar\omega}$, σ Wirkungsquerschnitt von bR $\sim 2,4 \cdot 10^{-16} \text{cm}^2$) klein gegen τ^{-1} ist, also schwaches Meßlicht benutzt wird.

$\varepsilon(\lambda)$ wird Extinktionskoeffizient genannt, seine Wellenlängenabhängigkeit legt das Absorptionsspektrum der Spezies fest, seine Einheit ist $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Der dimensionslose Exponent $\varepsilon(\lambda)cd$ wird Absorption A genannt. Zur besseren Charakterisierung des Wertes der Absorption ergänzt man den Wert um die Einheit OD oder mOD (optische Dichte). Zur Messung des Absorptionsspektrums $\varepsilon(\lambda)$ werden die Lichtintensitäten I_0 und I vor und nach der Probe gemessen und dabei die Wellenlänge des Meßlichtes mit einem Monochromator durchgestimmt. Die Bestimmung der Absorption durch die Probe alleine erfolgt in der Regel durch eine Differenzmessung zu einer Lösungsmittelprobe in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Shimadzu 2102UV), wodurch die Notwendigkeit I_0 zu messen entfällt. Ein typisches Spektrum von Bacteriorhodopsin ist in Abb. 5.2 zu sehen.

Neben der Absorption gibt es einen weiteren Beitrag zur Abschwächung des eingestrahnten Lichtes durch die Lichtstreuung an den Membranbruchstücken aufgrund des Brechungsindexunterschiedes zum umgebenden Lösungsmittel. Dies liefert einen wellenlängenabhängigen Streuuntergrund im Absorptionsspektrum und verschlechtert das Signal-Rauschverhältnis. Um diesen Untergrund zu eliminieren, wird das Streulicht der Probe von einem Integrationskugel-Einsatz im Spektralphotometer aufgefangen und zusammen mit dem transmittierten Licht auf den Detektor geleitet.

Hat man ein zeitabhängiges Gemisch verschiedener Spezies i , etwa aufgrund des Durchlaufens des Photozyklus nach der Anregung durch einen Laserblitz, so ist die Absorption zeit- und wellenlängenabhängig:

$$A(\lambda, t) = \sum_{i=0}^n \varepsilon_i(\lambda) c_i(t) d \quad \text{Gl. 2.3}$$

Dagegen liegt vor der Blitzanregung bR nur im Grundzustand vor, und somit:

$$A(\lambda, t < 0) = \varepsilon_{bR}(\lambda) c_0 d \quad \text{Gl. 2.4}$$

Die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen werden bei fester Wellenlänge λ des Meßlichtes durchgeführt. Zunächst wird die Intensität $I(\lambda, t < 0)$ des durch die Probe transmittierten Lichtes vor der Anregung durch den Laserblitz gemessen. Mit Einsetzen des Laserblitzes startet ein Transientenrecorder die Messung der Intensität $I(\lambda, t)$. Die Absorptionsänderung während dem Photozyklus wird dann errechnet aus:

$$\Delta A(\lambda, t) = A(\lambda, t) - A(\lambda, t < 0) = \log_{10} \frac{I(\lambda, t < 0)}{I(\lambda, t)}. \quad \text{Gl. 2.5}$$

Dadurch ist die Messung der Intensität I_0 vor der Probe nicht notwendig. Außerdem entsteht kein Fehler durch die Streuung der Probe, vorausgesetzt, daß diese sich nicht während des Zyklus ändert. Die absolute zeitaufgelöste Absorption $A(\lambda, t)$ ergibt sich durch hinzuaddieren der Absorption vor der Anregung, die etwa durch eine Messung im Spektralphotometer erhalten wird. Um die Wellenlängenabhängigkeit zu erhalten, werden viele solcher Messungen durchgeführt.

Mit Gl. 2.3 und Gl. 2.4 läßt sich die gemessene Absorptionsänderung durch die Konzentrationsverläufe ausdrücken.

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=0}^n \varepsilon_i(\lambda) c_i(t) d - \varepsilon_{bR}(\lambda) c_0 d \quad \text{Gl. 2.6}$$

Berücksichtigt man, daß die Teilchenzahl erhalten bleibt (und damit auch die Konzentration c_0) gilt zu jeder Zeit $c_0 = \sum_{i=0}^n c_i(t)$. Benutzt man zusätzlich noch die Nomenklatur $\varepsilon_{bR} \equiv \varepsilon_0$, so erhält man:

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=0}^n (\varepsilon_i(\lambda) - \varepsilon_{bR}(\lambda)) c_i(t) d = \sum_{i=1}^n (\varepsilon_i(\lambda) - \varepsilon_{bR}(\lambda)) c_i(t) d \quad \text{Gl. 2.7}$$

Das bedeutet, daß die zeitaufgelösten Absorptionsänderungen sich zu jedem Zeitpunkt durch die Differenzspektren der Intermediate und deren Konzentrationen ausdrücken lassen. Die Konzentrationen der Intermediate sind durch die Kinetik des Photozyklus gegeben. Für den Spezialfall, daß sich der Photozyklus durch ein Differentialgleichungssystem 1. Ordnung beschreiben läßt (siehe Kapitel 3, Gl. 3.6), ist der Konzentrationsverlauf der Intermediate in folgender Form darstellbar:

$$c_i(t) = \sum_{j=1}^n a_{ij} e^{-k_j t} \quad \text{Gl. 2.8}$$

Dann läßt sich Gl. 2.7 umschreiben in die Form:

$$\Delta A(\lambda, t) = d \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^n a_{ij} (\varepsilon_i(\lambda) - \varepsilon_{bR}(\lambda)) e^{-k_j t} \equiv d \sum_{j=1}^n B_j(\lambda) e^{-k_j t} \quad \text{Gl. 2.9}$$

Das bedeutet, der Photozyklus läßt sich bei jeder Wellenlänge durch denselben Satz von Raten k_j beschreiben. Die dadurch definierten Amplitudenspektren $B_j(\lambda)$ beinhalten die kinetischen Parameter a_{ij} und die Differenzspektren der Intermediate. Bei der kinetischen Analyse des Photozyklus ist es das Ziel, aus den gemessenen zeitaufgelösten Absorptionsänderungen das Reaktionsschema und die Intermediatenspektren zu extrahieren. Dies wird dadurch erschwert, daß einige Intermediate gleiche oder ähnliche Spektren besitzen, und daß einige Raten dicht beieinander liegen.

Eine einfachere Interpretation der gemessenen Daten ist möglich, wenn ein sequentieller Zyklus ohne Rückreaktion und weit auseinander liegende Raten zugrunde gelegt werden. Unter diesen Voraussetzungen, wird der Konzentrationsverlauf jedes Intermediates mit jeweils nur einer Aufbau- und Zerfallsrate und mit der Amplitude des anfänglich angeregten Grundzustand c_0^* beschrieben. Damit vereinfachen sich Gl. 2.8 und Gl. 2.9 zu:

$$c_i(t) = c_0^* (-e^{-k_i t} + e^{-k_{i+1} t})$$

und

Gl. 2.10

$$\Delta A(\lambda, t) = c_0^* d \sum_{i=1}^n (\varepsilon_{i-1}(\lambda) - \varepsilon_i(\lambda)) e^{-k_i t}$$

In diesem einfachen Fall ist das zur Rate k_i gehörende Amplitudenspektrum $B_i(\lambda)$ das Differenzspektrum der beiden Intermediate zwischen denen der Übergang stattfindet. Dabei wurde in der letzten Gleichung vorausgesetzt, daß das Spektrum des letzten Intermediats $\varepsilon_n(\lambda)$ gleich dem des Ausgangszustand $\varepsilon_{bR}(\lambda)$ ist, da sonst ein zeitlich konstanter Term übrig bleibt.

Der apparative Aufbau der Absorptionsspektroskopie wird später kurz beschrieben.

2.2 Die Methode der kapazitiven Kopplung

Zum Verständnis der Entstehung des Spannungssignals ist in Abb. 2.1 ein idealisiertes Schaltbild gegeben.

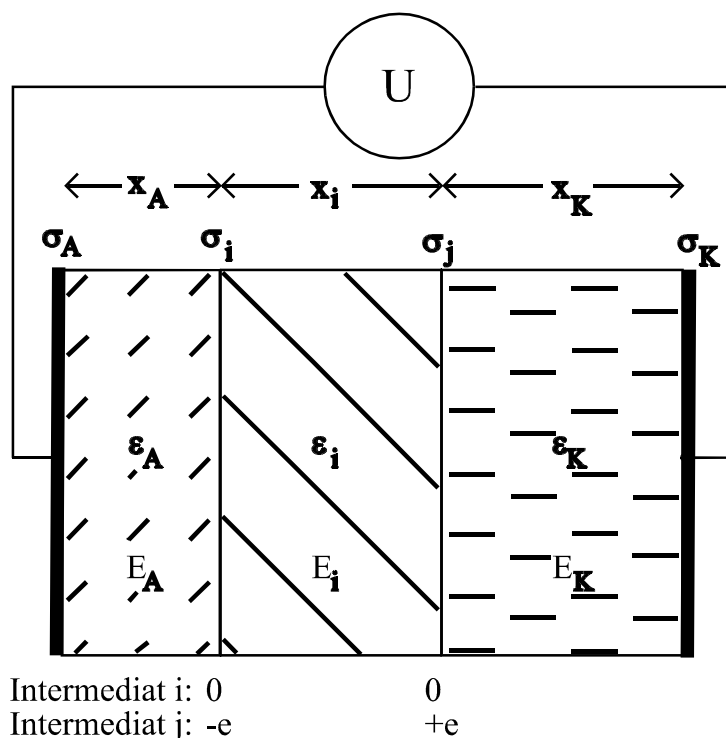


Abb. 2.1 Prinzip der kapazitiven Kopplung. Das Protein wird durch Schichten von homogenen Dielektrika beschrieben. Die Platten des Kondensators (mit Index A und K für Anode und Kathode) charakterisieren die Elektrolytlösung, über die die Spannung abgegriffen werden kann. Beim Übergang vom Intermediat i zum Intermediat j wird eine Elementarladung e über den Weg x_i verschoben. ε ist die Dielektrizitätskonstante und E das elektrische Feld in der jeweiligen Schicht, σ ist die Flächenladungsdichte auf der Grenzfläche zwischen zwei Schichten. Zur Vereinfachung wurden nur drei Schichten berücksichtigt, die Indizes A bzw. K symbolisieren die Schicht vor der Anode bzw. der Kathode.

In diesem Modell wird das Membranprotein durch Schichten von homogenen Dielektrika beschrieben, wobei jedes Intermediat dadurch charakterisiert ist, daß sich die Grenzschichten in einem bestimmten Ladungszustand befinden. Beim Übergang vom Intermediat i zu j wird die Elementarladung e um die Strecke x_i verschoben. In diesem idealisierenden Modell werden Randeffekte und Änderungen der Eigenschaften der Schichten während einer Verschiebung, etwa eine Zunahme des Dielektrizitätswertes durch Öffnung eines Wasserkanals, vernachlässigt. Damit ist dies sicher keine detaillierte Beschreibung des Ladungstransports durch das Membranprotein, jedoch ermöglichen diese Annahmen die

Herleitung einer Gleichung, die zum qualitativen Verständnis des Signalverlaufs führt. Unter diesen Annahmen sind auch die Felder homogen. Bei vernachlässigbarer Leitfähigkeit der Schichten kann dann die Spannung über dem Gesamtsystem mit rein elektrostatischen Methoden berechnet werden.

Dazu ist es notwendig, die von den internen Flächenladungsdichten (σ_i und σ_j) induzierten Influenzladungen auf den äußeren Kondensatorplatten (σ_A und σ_K) zu berechnen. Mit diesen Influenzladungen ist auch die Spannung über dem Schichtsystem gegeben:

$$U = \frac{\sigma_A - \sigma_K}{2c_{ges}} \quad \text{Gl. 2.11}$$

Dabei ist c_{ges} die spezifische Gesamtkapazität der gestapelten dielektrischen Schichten:

$$c_{ges} = \varepsilon_0 \left(\frac{x_A}{\varepsilon_A} + \frac{x_i}{\varepsilon_i} + \frac{x_K}{\varepsilon_K} \right)^{-1} \quad \text{Gl. 2.12}$$

An den zwei Kondensatorplatten und den zwei internen Grenzschichten gelten die folgenden Bedingungen:

$$E_A = \frac{\sigma_A}{\varepsilon_0 \varepsilon_A}, \quad \varepsilon_i E_i - \varepsilon_A E_A = \frac{\sigma_i}{\varepsilon_0}, \quad \varepsilon_K E_K - \varepsilon_i E_i = \frac{\sigma_j}{\varepsilon_0}, \quad E_K = -\frac{\sigma_K}{\varepsilon_0 \varepsilon_K} \quad \text{Gl. 2.13}$$

Diese Grenzbedingungen erfüllen die Ladungsneutralität. Durch eliminieren von E_A und E_K werden die vier Gleichungen auf zwei Gleichungen reduziert, in denen die drei zu bestimmenden Größen E_i , σ_A und σ_K stecken.

$$\varepsilon_i E_i - \frac{\sigma_A}{\varepsilon_0} = \frac{\sigma_i}{\varepsilon_0}, \quad -\varepsilon_i E_i - \frac{\sigma_K}{\varepsilon_0} = \frac{\sigma_j}{\varepsilon_0} \quad \text{Gl. 2.14}$$

Um alle drei Größen eindeutig zu bestimmen, benötigt man eine dritte Gleichung. Dazu wird die gesuchte Spannung in folgender Form ausgedrückt:

$$U = \int_A^K E(x) dx = E_A x_A + E_i x_i + E_K x_K \quad \text{Gl. 2.15}$$

Gleichsetzten dieses Ausdrucks mit Gl. 2.11 und Einsetzten der Relationen Gl. 2.12 und Gl. 2.13 ergibt folgende Gleichung:

$$\frac{\sigma_A x_A}{\varepsilon_0 \varepsilon_A} - \frac{\sigma_K x_K}{\varepsilon_0 \varepsilon_K} + E_i x_i = (\sigma_A - \sigma_K) \frac{1}{\varepsilon_0} \left(\frac{x_A}{\varepsilon_A} + \frac{x_i}{\varepsilon_i} + \frac{x_K}{\varepsilon_K} \right) \quad \text{Gl. 2.16}$$

Die Gl. 2.14 zusammen mit Gl. 2.16 sind drei unabhängige Gleichungen zur Bestimmung der Größen σ_A , σ_K und E_i in Abhängigkeit von σ_i und σ_j .

$$\sigma_A = -\frac{\sigma_j \frac{x_i}{\varepsilon_i} + (\sigma_i + \sigma_j) \frac{x_A}{\varepsilon_A}}{\frac{x_A}{\varepsilon_A} + \frac{x_i}{\varepsilon_i} + \frac{x_K}{\varepsilon_K}}, \quad \sigma_K = -\frac{\sigma_i \frac{x_i}{\varepsilon_i} + (\sigma_i + \sigma_j) \frac{x_K}{\varepsilon_K}}{\frac{x_A}{\varepsilon_A} + \frac{x_i}{\varepsilon_i} + \frac{x_K}{\varepsilon_K}} \quad \text{Gl. 2.17}$$

Diese beiden Größen lassen sich in Gl. 2.11 einsetzen, dadurch wird die Spannung in Abhängigkeit der Ladungsdichten auf den inneren Schichten und den Parametern der Schichten erhalten:

$$U = \frac{1}{2\varepsilon_0} \left(\sigma_i - \sigma_j \right) \frac{x_i}{\varepsilon_i} + \left(\sigma_i + \sigma_j \right) \left(\frac{x_K}{\varepsilon_K} - \frac{x_A}{\varepsilon_A} \right) \quad \text{Gl. 2.18}$$

Betrachtet man nun einen Übergang vom Ladungszustand $\sigma_i = \sigma_j = 0$ zu einem mit $\sigma_i = -\sigma$ und $\sigma_j = +\sigma$ so ergibt sich folgende Spannungsdifferenz:

$$\Delta U_i = U(\sigma_i = \sigma_j = 0) - U(\sigma_i = -\sigma, \sigma_j = +\sigma) = \sigma \frac{x_i}{\epsilon_0 \epsilon_i} \quad \text{Gl. 2.19}$$

Das bedeutet, daß unabhängig von der Beschaffenheit der umgebenden Schichten die Spannungsamplitude der Ladungsverschiebung immer proportional zur verschobenen Ladungsdichte σ und Verschiebeweg x_i und umgekehrt proportional zur Dielektrizitätskonstanten ϵ_i der inneren Schicht ist. Daher läßt sich das Modell erweitern auf viele Schichten x_i, ϵ_i , wobei bei jedem Übergang eine zusätzliche Amplitude ΔU_i entsteht. Wenn das Intermediat i dadurch charakterisiert ist, daß die Elementarladung e auf der Fläche A bereits alle Teilstrecken $x_n, n=1, \dots, i$ durchlaufen hat, dann kann man für jedes Intermediat eine Teilspannung definieren:

$$u_0 = 0$$

$$u_1 = \frac{x_1}{\epsilon_0 \epsilon_1} \frac{e}{A}$$

$$u_2 = \frac{x_1}{\epsilon_0 \epsilon_1} + \frac{x_2}{\epsilon_0 \epsilon_2} \left| \frac{e}{A} \right. \quad \text{Gl. 2.20}$$

⋮

$$u_n = \frac{e}{A} \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{\epsilon_0 \epsilon_i}$$

Die Gesamtspannung eines Intermediatgemisches ergibt sich nun aus der Summe der Teilspannungen, wobei jede Teilspannung mit der Anzahl der Moleküle im entsprechenden Intermediat N_i gewichtet wird:

$$U = \sum_{i=1}^n u_i N_i = \sum_{i=1}^n N_i \frac{e}{A} \sum_{j=1}^i \frac{x_j}{\epsilon_0 \epsilon_j} = \sum_{i=1}^n I_i \Psi_i \quad \text{mit} \quad \Psi_i \equiv F \sum_{j=1}^i \frac{x_j}{\epsilon_0 \epsilon_j} \quad \text{Gl. 2.21}$$

Im letzten Schritt wurde $N_i/N_A A$ mit der Flächenkonzentration des Intermediat I_i identifiziert (N_A ist hier die Avogadrozahl, $F=N_A e$ ist die Faraday-Konstante) und die Definition für den Elektrogenitätskoeffizienten Ψ_i als die erreichte Spannung bis zum i -ten Intermediat eingeführt. Nimmt man nun wieder ein sequentielles lineares Reaktionsmodell ohne Rückreaktion und weit auseinanderliegenden Raten an, also $I_i(t) = I_0^* (e^{-k_{i+1}t} - e^{-k_i t})$, mit der zu Beginn des Zyklus angeregten Konzentration I_0^* , so erhält man das zeitabhängige Spannungssignal:

$$\begin{aligned} U(t) &= \sum_{i=1}^n I_i(t) \Psi_i \\ &= F I_0^* \sum_{i=1}^n (e^{-k_{i+1}t} - e^{-k_i t}) \sum_{j=1}^i \frac{x_j}{\epsilon_0 \epsilon_j} \left| \quad \text{Gl. 2.22} \right. \\ &= -F I_0^* \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{\epsilon_0 \epsilon_i} (1 - e^{-k_i t}) \end{aligned}$$

Dabei wurde im letzten Schritt $k_{n+1}=0$ benutzt, da ein stabiler Endzustand erreicht wird. Der Zeitverlauf der Spannung enthält also die exponentielle Zeitabhängigkeit des Übergangs von $i \rightarrow i+1$ und als Amplitude den dazugehörigen Verschiebeweg geteilt durch die Dielektrizitätskonstante. Dieser Zusammenhang wird zur Interpretation von Spannungsmessungen immer wieder herangezogen. Benutzt man anstatt des Spannungsmeßgerätes ein Strommeßgerät mit verschwindendem Innenwiderstand, so wird

die Ladung, die bei Spannungsmessungen aufgebaut wird, über das Strommeßgerät abfließen. In diesem Fall gilt:

$$i(t) = C \frac{dU(t)}{dt} = -CFI_0^* \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{\epsilon_0 \epsilon_i} k_i e^{-k_i t} \quad \text{Gl. 2.23}$$

In dieser Gleichung für den sequentiellen Zyklus erkennt man, daß bei zeitaufgelösten Strommessungen die Amplituden abhängig von der Rate sind. Daher gibt es bei langsamen Prozessen bei Strommessungen das Problem, diese aufgrund der geringen Amplitude noch aufzulösen.

2.3 Das Prinzip der elektrischen Messungen

Die direkte Messung der Spannung über der proteinhaltigen Membran, wie durch Abb. 2.1 impliziert, ist leider nicht möglich, da sich keine makroskopischen Kompartimente erzeugen lassen, die allein durch die Purpurmembraan getrennt sind. Daher wird hier die Methode der angelagerten Membranbruchstücke angewandt. Dabei wird eine Polyethylenfolie zwischen den beiden Kompartimenten einer Küvette eingespannt (Abb. 2.2). Die eine Seite der Folie wird zunächst mit einer Lipidschicht und einer Substanz, die die Lipidoberfläche positiv auflädt, imprägniert. Anschließend wird auf dieser Seite der Folie eine Suspension mit Purpurmembraanbruchstücken eingefüllt, wobei sich dann die Membranbruchstücke an der imprägnierten Folie orientiert anlagern und die Zellaußenseiten der Bruchstücke gegenüber den Innenseiten elektrisch isoliert sind. Die zwischen den Kompartimenten gemessene Spannung ist gegenüber dem idealisierten Fall im vorhergehenden Abschnitt verändert, da die Membrankapazität mit der Folienkapazität einen Spannungsteiler bildet. Außerdem besitzt die Membran einen endlichen Widerstand und der Meßverstärker einen Shuntwiderstand, über den sich das System bei langen Meßzeiten wieder entlädt.

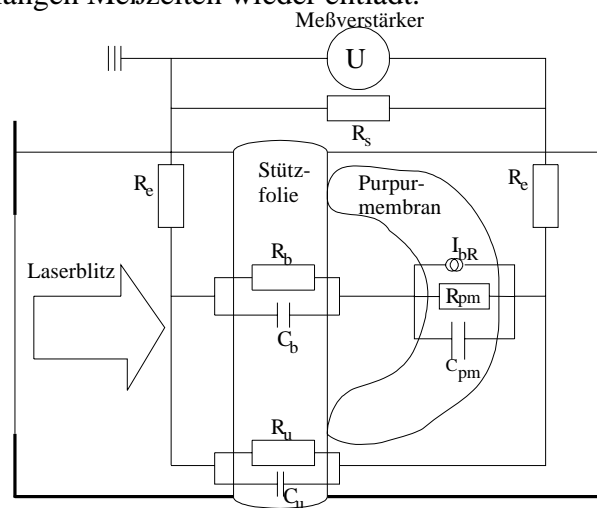


Abb. 2.2 Schematische Zeichnung der Meßküvette und Ersatzschaltbild für das System aus Stützfolie und Purpurmembraan. Die Indizes u und b dienen zur Unterscheidung zwischen bedecktem und unbedecktem Teil der Stützfolie. Der Index pm steht für die Eigenschaften der Purpurmembraan, und Index e für den Elektrolytwiderstand. I_{br} ist der Strom den die Ionenpumpe erzeugt, er ist durch Gl. 2.23 mit der Spannung über der Purpurmembraan verknüpft. Gemessen wird jedoch die Spannung U über dieser Anordnung aus Stützfolie und Purpurmembraan. Der Shuntwiderstand R_s von $50 \text{ G}\Omega$ sorgt für einen langsamen Ladungsausgleich zwischen den beiden Kompartimenten.

Bei Vernachlässigung des Elektrolytwiderstandes R_e (einige $\text{k}\Omega$) gegenüber dem Shuntwiderstand R_s (einige $\text{G}\Omega$) läßt sich die Schaltung mit Hilfe der Laplacetransformation analysieren (Holz et al., 1988; Borlinghaus et al., 1987; Moltke, 1993). Der Weg sei hier nur kurz skizziert: Mit den komplexen Admittanzen

$$Y_u = R_u^{-1} + R_s^{-1} + sC_u, \quad Y_b = R_b^{-1} + sC_b, \quad Y_{pm} = R_{pm}^{-1} + sC_{pm}, \quad s = i\omega \quad \text{Gl. 2.24}$$

und mit den Kirchhoffschen Regeln erhält man:

$$U = I_{bR} \frac{Y_b}{Y_u Y_{pm} + Y_u Y_b + Y_b Y_{pm}} \quad \text{Gl. 2.25}$$

Mit einem Strom, der einer exponentiellen Relaxation entspricht und dessen Laplace-transformierten,

$$I_{bR}(t) = I_0 e^{-k_0 t} \Leftrightarrow I_{bR}(s) = \frac{I_0}{s + k_0} \quad \text{Gl. 2.26}$$

und unter der Vernachlässigung des Stützfolienwiderstandes R_b und R_u erhält man:

$$U(s) = \frac{I_0}{s + k_0} \frac{sC_b}{\left(\frac{1}{R_s} + sC_u\right) \left(\frac{1}{R_{pm}} + sC_{pm}\right) + \left(\frac{1}{R_s} + sC_u\right) sC_b + sC_b \left(\frac{1}{R_{pm}} + sC_{pm}\right)} \quad \text{Gl. 2.27}$$

$$= \frac{\mathcal{A}_0}{(\gamma C_u + C_{pm})(s + k_0)(s + k_{sys1})(s + k_{sys2})}$$

Zur Umformung von der ersten in die zweite Zeile wurden als Abkürzungen der Bedeckungsgrad $\gamma \equiv C_b / (C_b + C_u)$, und die unten definierten Größen k_{sys1} und k_{sys2} eingeführt. Für die zweite Zeile läßt sich nun bequem die inverse Laplacetransformation durchführen, und man erhält folgende Form für die Meßgröße $U(t)$:

$$U(t) = U_0 e^{-k_0 t} + U_1 e^{-k_{sys1} t} + U_2 e^{-k_{sys2} t} \quad \text{Gl. 2.28}$$

In der Meßgröße tauchen also neben der intrinsischen Rate k_0 noch zwei weitere Relaxationen k_{sys1} und k_{sys2} auf, die durch das Meßsystem gegeben sind. Dabei sind die Amplituden:

$$U_0 = \frac{\mathcal{A}_0}{(\gamma C_u + C_{pm})} \cdot \frac{k_0}{(k_{sys1} - k_0)(k_{sys2} - k_0)}$$

$$U_1 = \frac{\mathcal{A}_0}{(\gamma C_u + C_{pm})} \cdot \frac{k_{sys1}}{(k_0 - k_{sys1})(k_{sys2} - k_{sys1})} \quad \text{Gl. 2.29}$$

$$U_2 = \frac{\mathcal{A}_0}{(\gamma C_u + C_{pm})} \cdot \frac{k_{sys2}}{(k_0 - k_{sys2})(k_{sys1} - k_{sys2})}$$

Gegenüber einer erwarteten Spannungsamplitude von $U_0^{ernv} = \frac{I_0}{k_0 C}$ ist die gemessene Amplitude U_0 um den folgenden Faktor f_{sys} größer:

$$f_{sys} = \frac{k_0^2}{(k_{sys1} - k_0)(k_{sys2} - k_0)} \quad \text{Gl. 2.30}$$

Daher müssen die gemessenen Amplituden diesem Faktor entsprechend korrigiert werden. In diesen Gleichungen sind die beiden Systemraten gegeben durch folgende Funktion der Widerstände und Kapazitäten, die auf einfache Weise durch Faktorisieren des Nenners in Gl. 2.27 erhalten wird:

$$k_{sys1/2} = \frac{\frac{C_b + C_u}{R_{pm}} + \frac{C_b + C_{pm}}{R_s} \pm \sqrt{\left(\frac{C_b + C_u}{R_{pm}} + \frac{C_b + C_{pm}}{R_s}\right)^2 - \frac{4((C_b + C_u)C_{pm} + C_u C_b)}{R_s R_{pm}}}}{2((C_b + C_u)C_{pm} + C_u C_b)} \quad \text{Gl. 2.31}$$

Weil die spezifische Kapazität der 3-4 nm dicken Purpurmembraan sehr viel höher ist als die der 2 μm dicken Stützfolie, gilt ohne großen Fehler $C_{pm} + C_b \approx C_{pm}$ und außerdem $(C_b + C_u)C_{pm} + C_u C_b \approx (C_u + C_b)C_{pm}$. Damit läßt sich die Wurzel aus obigem Ausdruck ziehen und es gilt unabhängig vom Bedeckungsgrad der Folie:

$$k_{\text{sys}1} \approx \frac{1}{R_s (C_b + C_u)}, \quad k_{\text{sys}2} \approx \frac{1}{R_{pm} C_{pm}} \quad \text{Gl. 2.32}$$

Das bedeutet, daß eine Systementladungskomponente durch die Eigenschaften der Stützfolie und des Shuntwiderstands gegeben sind, während die andere Systemkomponente überwiegend durch die Entladung über die Purpurmembraan gegeben ist. Bei einer Stützfolienkapazität von 1 nF und einem Shuntwiderstand von 50 G Ω ergibt sich eine Entladungsrate über das äußere System von $k_{\text{sys}1} = 2 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$. Typische spezifische Werte für die Purpurmembraan sind 100 M Ωcm^2 und 5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, so daß sich eine Entladungsrate von $k_{\text{sys}2} = 2 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$ über die angelagerte Membraan ergibt. Daher limitiert die Entladung über den Shuntwiderstand die maximal sinnvolle Meßzeit auf theoretisch 50 s. In der Praxis wurde das Einsetzen der Systementladung bereits eine Zeitdekade früher also etwa mit 3-5 s beobachtet. Dies liegt vermutlich an unvermeidbaren Leckströmen über den Meßverstärker oder an einer nicht perfekten Isolierung der Purpurmembraanen gegen die Stützfolie.

2.4 Der experimentelle Aufbau der Doppelblitzapparatur

Die Apparatur der elektrischen Messung wurde von Dr. Stephan Moltke übernommen, mußte aber zur Durchführung von Doppelblitzexperimenten und zur Erhöhung der Zeitauflösung in nahezu allen Detailkomponenten, wie Meßverstärker, Anregungslaser, Elektroden, Meßküvette und der verwendeten Stützfolie verändert werden. Außerdem mußten Transientenrecorder, Universalzähler, IEEE-Interface, Photodioden, Delaygenerator, Datenaufnahmerechner und Meßprogramm neu angeschafft bzw. entwickelt werden. Dies wird im Folgenden ausführlicher dargestellt.

Zweck der Apparatur (Abb. 2.3) ist es, die Spannung über dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen System aus Stützfolie und angelagerten Purpurmembraanbruchstücken zeitaufgelöst nach der Blitzanregung aufzuzeichnen. Der gesamte Meßablauf wird durch einen 486er PC mit einer I/O-Einsteckkarte (Fa. Kolter) gesteuert. Zum Start der Messung gibt die I/O-Karte ein Signal zum Delaygenerator. Da die beiden Laser erst mit einer Zeitverzögerung ihre Blitze abgeben, mußte in Zusammenarbeit mit der Elektronik-Werkstatt ein Delaygenerator neu entwickelt werden, der mit Hilfe dreier einzelner Delays dafür sorgt, daß zwei Laserblitze in einem definierten Zeitabstand erfolgen. Die Genauigkeit des Delaygenerators beträgt 100 ns. Die Photodiode 1 (Hamamatsu S4710, 1 GHz Bandbreite) registriert die beiden kurzen Lichtblitze und ein Universalzähler (Philips PM6666) überprüft den Zeitabstand. Aufgrund der Triggergenauigkeit des Excimerlasers wurden Schwankungen von ± 200 ns zwischen den beiden Blitzen detektiert. Daher sind nur Zeitabstände länger als 1 μs sinnvoll. Außerdem dient diese Photodiode 1 dazu, die Datenaufnahme durch das schnelle Speicheroszilloskop zu starten. Eine zweite Photodiode erzeugt Pulse die länger als 50 μs sind, um den im PC befindlichen langsamen Abtastkanal zu starten. Die Spannung zwischen den beiden Kompartimenten der Küvette wird vom Meßverstärker (siehe Abschnitt 2.6) 100-fach erhöht und dann zu den beiden Digitalisierungskanälen geleitet. Dabei wird das Signal, das in den langsamen Abtastkanal der PC-Einsteckkarte gelangt, vorher von einem Tiefpaß geglättet. Zähler und Speicheroszilloskop sind über eine IEEE Schnittstelle (Meilhaus Mod. 488-PC2) an den PC angeschlossen, um die Daten zu übertragen. Ein weiterer Ausgang der I/O-Karte dient dazu, den Farbstofflaser mit einer ansteuerbaren Blende abwechselnd ein- und auszuschalten.

Außerdem besitzt die I/O-Karte eine „Sample and Hold“- Einheit, die die Amplitude des Spannungspulses von einem pyroelektrischen Detektor mißt, um die Laserenergie des Farbstofflasers zu kontrollieren. Durch einen Farbfilter vor der Photodiode 2 ist es möglich, die Datenaufnahme des zweiten Kanals auf Einsetzen des zweiten Blitzes zu starten. Im schnellen Kanal ist dies ebenfalls möglich, hier wird dies jedoch durch Programmierung des Oszilloskops erreicht.

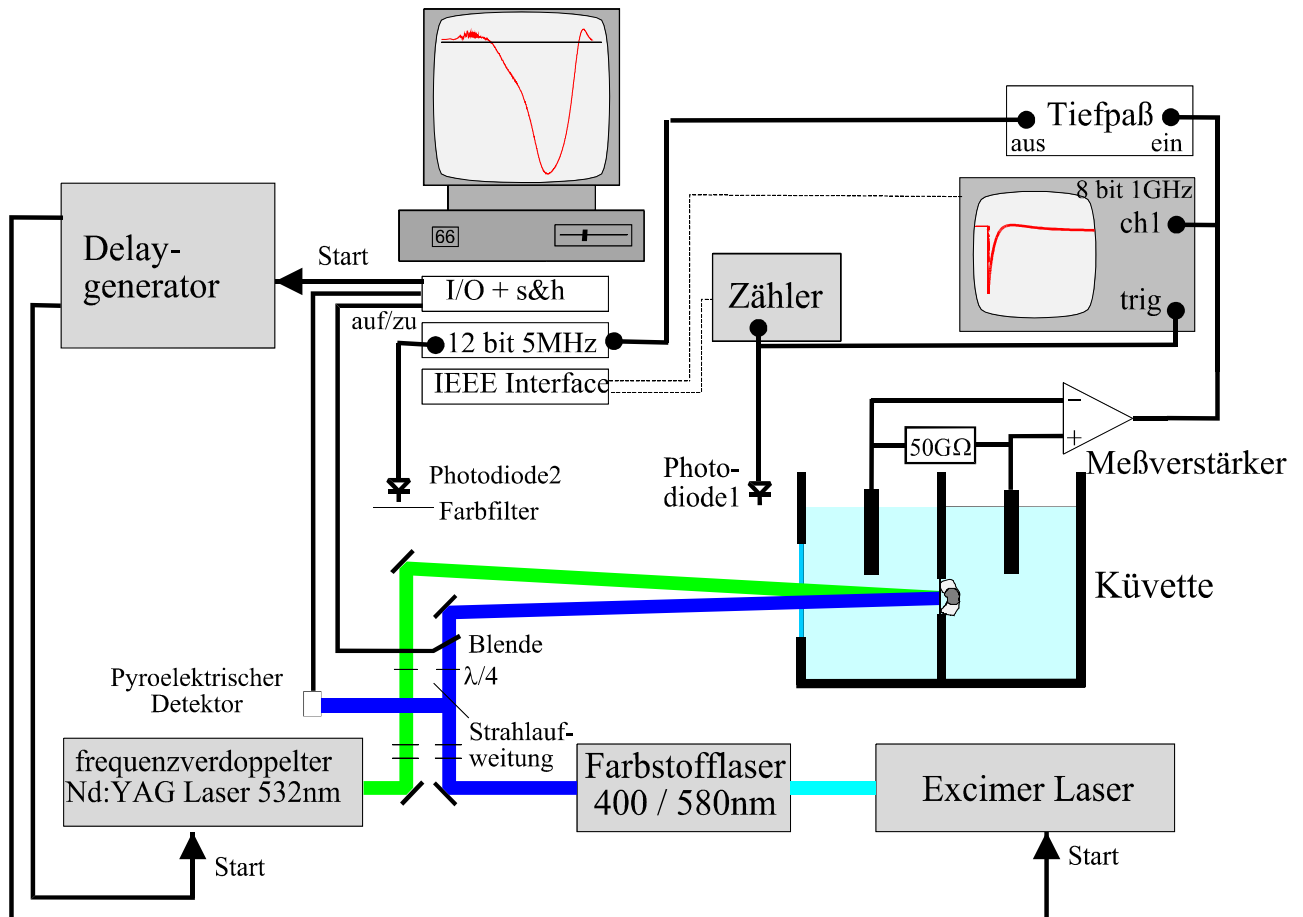


Abb. 2.3 Blockdiagramm der zeitaufgelösten Photospannungsmessung mit Doppelblitzanregung. Der Rechner gibt ein Startsignal an den Delaygenerator, der wiederum dafür sorgt, daß die beiden Laserblitze in einem definiert einstellbaren Zeitabstand erfolgen. Die Photodioden detektieren etwas Streulicht, das bei starken Laserblitzen immer auftritt. Die elektrischen Pulse von der Photodiode 1 werden von einem Universalzähler registriert, um zu überprüfen ob der eingestellte Zeitabstand wirklich eingehalten wird.

Die optischen Komponenten und der Faradaykäfig mit der Meßkuvette befinden sich auf einer schwingungsgedämpften Marmorplatte. Die Signalaufnahme in der Meßkuvette wird durch lichtunempfindliche Platinelektroden (Platindraht 1,0 mm Durchmesser, Fa. Goodfellow) realisiert. Diese haben gegenüber den früher benutzten stark lichtempfindlichen Ag/AgCl-Elektroden den Vorteil, daß sie direkt in die Meßkuvette eingebracht werden können und dadurch das Signal schneller übertragen. Die Meßkuvette besteht aus dem Werkstoff Delrin 100 und besitzt ein Quarzfenster. Sie ist thermostatisierbar und außerdem in einem kleinen Faradaykäfig untergebracht. Dieser kleine Faradaykäfig steht, zusammen mit dem Meßverstärker und der dazu gehörenden Stromversorgung durch Bleiakku, in einem weiteren größeren Faradaykäfig, der zusätzlich mit sogenanntem Mu-Metall abgeschirmt ist. Der Eintritt des Laserlichtes durch die beiden Faradaykäfige geschieht durch ein 15 cm langes Kupferrohr. Diese sorgfältige Abschirmung ist notwendig, da der im Nebenraum befindliche Excimerlaser eine starke elektronische Störquelle ist. Um diese Störungen weiter

einzdämmen, werden die Triggersignale an den Excimerlaser über Lichtleiterkabel zugeleitet, und um den Excimerlaser herum wurde eine zusätzliche Abschirmung aus 2 mm Stahlblech gebaut.

Die Digitalisierung des Spannungssignals erfolgt in zwei Kanälen. Den schnellen Kanal bildet das neu erworbene Speicheroszilloskop (LeCroy M9350A) mit kürzester Abtastzeit von 1 ns, 500 MHz Analogbandbreite, 8-bit Auflösung und 250 kSamples Speichertiefe. Die Datenübertragung des Samplespeichers zum Rechner geschieht über die IEEE Schnittstelle. Der langsame Kanal wird durch die Einsteckkarte T512 der Fa. IMTEC realisiert. Diese erreicht 12-bit Auflösung und besitzt eine Speichertiefe von 4 MSamples, die kürzeste Abtastzeit beträgt 200 ns. In der Regel wurde sie jedoch mit 10-50 μ s Abtastzeit betrieben. Damit ist es möglich, den gesamten Bereich von 1 ns bis 3 min zu erfassen, wobei im Überlappbereich der beiden Kanäle dann jedoch nur noch 4 Meßpunkte des zweiten Kanals liegen. Diese benötigt man, um die beiden Kanäle aufgrund leichter Abweichungen im Verstärkungsfaktor und Offset aufeinander abzugleichen.

Wegen des neu erworbenen Speicheroszilloskops und der hinzugekommenen Aufgabe Doppelblitze durchzuführen, wurde ein neues Meßprogramm in C++ entwickelt. Das Prinzip der logarithmischen Datenreduktion und der Mittelung über mehrere Zyklusanregungen blieb jedoch gleich. Sinn der logarithmischen Datenreduktion ist es, die pro Messung produzierte große Datenmenge (hier über 8 MByte) auf eine mit dem Rechner besser verarbeitbare Größe zu reduzieren. Dies ist möglich, da zur Beschreibung exponentieller Relaxationen mit wachsender Zeit nach der Anregung immer weniger Meßpunkte pro Zeitintervall benötigt werden. Zur Datenreduktion wird ein logarithmisch äquidistantes Zeitraster von 100 Zeitpunkten pro Dekade durch die folgenden Zeitpunkte definiert:

$$t_i = 10^{i/100} \text{ ns}, \quad i = 0, \dots, 1000 \quad \text{Gl. 2.33}$$

Die linearen Meßpunkte werden dazu nach dem Algorithmus von Moltke (1993) in dieses Zeitraster eingeordnet. Da zu einem späteren logarithmischen Meßpunkt sehr viel mehr lineare Datenpunkte beitragen als zu früheren, nimmt das Signal-Rauschverhältnis dieser reduzierten Daten mit steigender Zeit stark zu (siehe z.B. Abb. 7.3). Der reduzierte Datensatz besteht in der Regel aus etwa 900 Zeitpunkten.

Um das Signal Rauschverhältnis weiter zu verbessern, wird die Messung mehrmals wiederholt, in der Regel 5-10 mal. Am Ende wird dann nur der Mittelwert über die Einzelmessungen gespeichert. Bei der Auswertung von Doppelblitzexperimenten (siehe unten) werden immer Differenzen zwischen einer Messung mit nur einem Blitz und einer zweiten Messung mit zwei Blitzen gebildet. Da sich während einer Meßreihe die Signalform leicht ändern kann und die Differenzen zwischen den beiden Messungen recht klein sind, wurden zur Steigerung der Genauigkeit bei Doppelblitzexperimenten Meßreihen durchgeführt, bei denen das Meßprogramm mit Hilfe der ansteuerbaren Blende immer eine Messung mit und danach eine Messung ohne zweiten Blitz durchführt und diesen Ablauf mehrmals wiederholt.

2.5 Das Lasersystem

Zur effizienten Anregung des Grundzustandes ist eine Wellenlänge im Bereich von etwa ± 40 nm um das Absorptionsmaximum von 570 nm erforderlich. Dazu geeignet ist ein gütegeschalteter, frequenzverdoppelter Neodym:YAG Laser, welcher Licht mit 532 nm emittiert (Spectra Physics Modell GCR-16). Die Energie wird auf 5-15 mJ stark abgeschwächt.

Der zweite Lichtblitz, der die Photoreaktion der Intermediate startet, wird durch einen von einem Excimerlaser gepumpten Farbstofflaser erzeugt. Der Excimerlaser (Radiant Dyes Modell EXE 100) wird mit XeCl betrieben und liefert UV-Blitze von 308 nm mit einer

Energie bis zu 150 mJ, welche jedoch stark abhängig vom Zustand des Gasgemisches ist. Der Selbstbau-Farbstofflaser besteht nur aus einer Farbstoffküvette und einem Endspiegel. Da die untersuchten Retinalproteine 100 nm breite, homogene Absorptionsbanden haben, wurde auf frequenzselektive Elemente zugunsten der erforderlichen Energie verzichtet. Als Laserfarbstoffe wurden bei den unterschiedlichen Wellenlängen Rhodamin6G (580 nm), Coumarin (500 nm), Stilben3 (420 nm) und PBBO (400 nm) benutzt und Energien zwischen 2-20 mJ erhalten. Die Pulsdauern der Laserblitze wurden mit einer Photodiode überprüft (Abb. 2.4). Sie liegen für beide Laser unterhalb 20 ns, so daß für die Anregung des Grundzustandes ausgeschlossen ist, daß Photoreaktionen von anderen Intermediaten als von bR, J, oder K stattfinden.

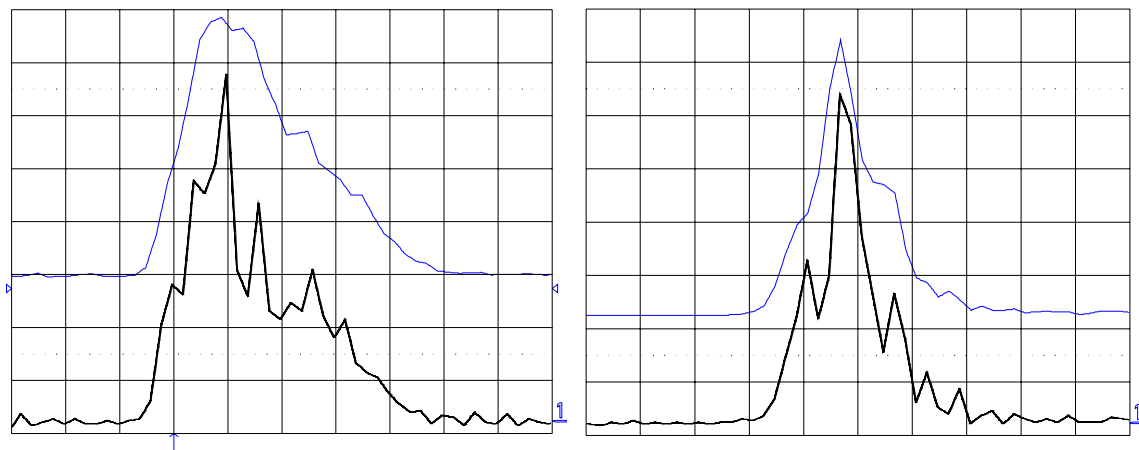


Abb. 2.4 Messung der Laserpulse mit einer Photodiode (GaAs, Hamamatsu S4710, 1 GHz Bandbreite, mit 12 V Vorspannung in 50 Ω betrieben) und dem 500 MHz Oszilloskop (LeCroy M9350A). Die horizontale Zeitskala ist 5 ns pro Boxeinheit. Links der Farbstofflaser mit R6G und rechts der frequenzverdoppelte Neodym:YAG Laser. Beide besitzen eine charakteristische Struktur mit kurzen Peaks, die sich auch durch Mittelung nicht vollständig glätten. Das jeweils untere Signal ist von einem einzelnen Blitz, das jeweils obere ist über 50 Blitze gemittelt.

Beide Laserblitze sind vertikal polarisiert und werden mit einem $\lambda/4$ -Plättchen zirkular polarisiert. Da die Membranen parallel an der Stützfolie angelagert sind und der Chromophor nahezu parallel zu dieser Membranfläche orientiert ist (ca. 20°), erzielt man mit der zirkularen Polarisation eine hohe Anregung für alle angelagerten Membranmoleküle.

2.6 Die Analogelektronik

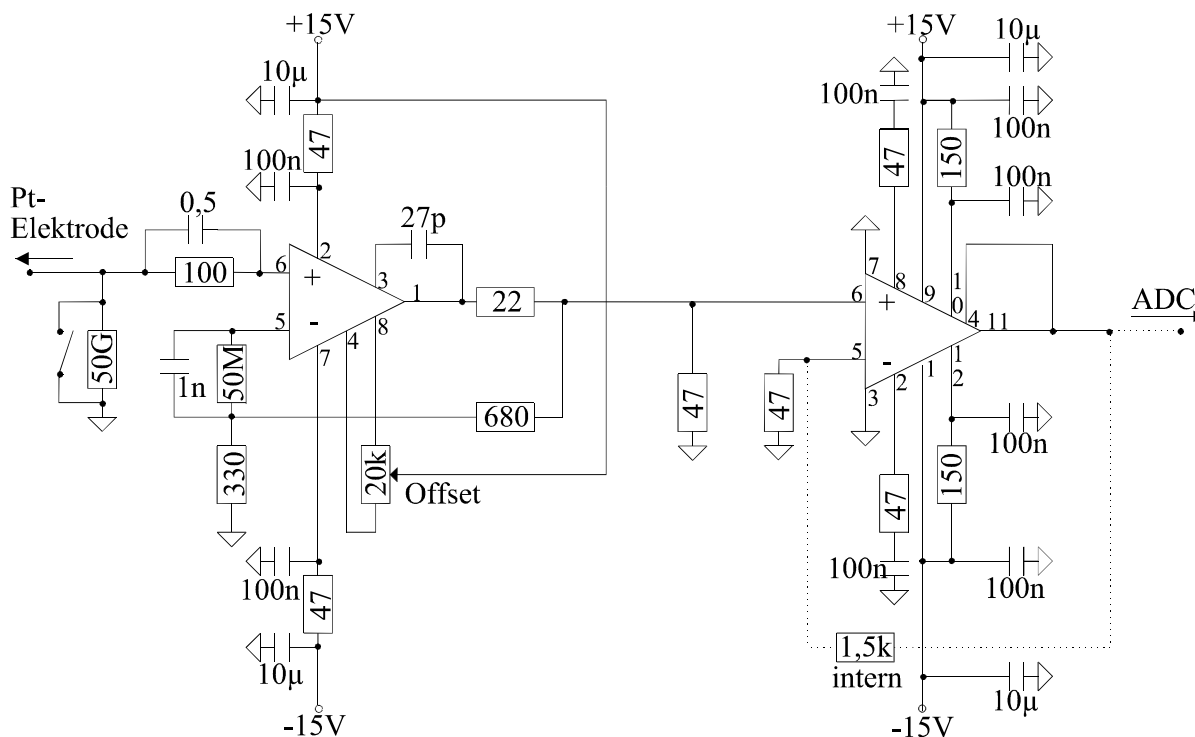


Abb. 2.5 Die elektronische Schaltung des Verstärkers. Um die Elektronik bei Eingriff in die Küvette zu schützen, etwa bei der Kontrolle von Temperatur oder pH, ist ein Schalter am Eingang des Verstärkers angebracht. Der interne Offset der ersten Stufe wird benutzt, um das Spannungssignal in den Meßbereich der Sampleelektronik zu bringen. Die Ausgangsspannung der zweiten Verstärkerstufe ist begrenzt auf ± 2.5 V (durch Widerstände an Pin 10 und 12), um ihn vor Überhitzung zu schützen. Bei großen Signalen wird daher durch Vergrößern des Widerstands an Pin 5 die Verstärkung der zweiten Stufe herabgesetzt.

Um bessere Anstiegszeiten zu erhalten, wurde der Spannungsverstärker der elektrischen Apparatur nach Abb. 2.5 neu aufgebaut. Es handelt sich um einen zweistufigen Verstärkeraufbau. In der Eingangsstufe wurde der hochohmige ($R_{in} > 10^{11} \Omega$) FET-Operationsverstärker Burr Brown 3554 (der bereits in der vorherigen Schaltung benutzt wurde) belassen, jedoch wurde die Verstärkung von 100 auf 3 herabgesetzt, und dadurch die Bandbreite etwa verdreifacht. Den wesentlichen Verstärkungsfaktor von 33 bringt erst die neu hinzugekommene zweite Stufe, so daß die Gesamtverstärkung wieder 100 beträgt. Die Schaltung wurde am Kompensationskondensator der ersten Stufe so justiert, daß beim Test mit einem Pulsgenerator (Hewlett-Packard Modell 214B, Anstiegszeit < 5 ns) und dem 500 MHz Speicheroszilloskop kein Überschwinger auftritt. Der Test zeigte einen zweiphasigen Anstieg der Ausgangsspannung mit 11 und 25 ns (-76% und 176%). In der Praxis waren diese beiden Komponenten nicht mehr trennbar, da hier der K-Anstieg nur eine kleine Amplitude besitzt und deshalb das schlechte Signal/Rauschverhältnis nur eine einzige Anstiegszeit in der Anpassung zuläßt, die in der Regel zwischen 25 und 35 ns betrug. Mit diesem Wert ist man auch fast an der physikalischen Grenze der mit diesem Meßsystem erzielbaren Anstiegszeit, da der Elektrolytwiderstand von etwa $10 \text{ k}\Omega$ und die Eingangskapazität des Verstärkers (Burr Brown 3554) von 2 pF eine untere Grenze von 20 ns ergeben.

2.7 Präparation der Proben, Standardbedingungen

Die Spannungsmessung erfolgt mit einer Küvette (siehe Abb. 2.6) aus dem Werkstoff Delrin 100 (Holz et al., 1988). Sie besteht aus zwei Kompartimenten K_1 und K_2 , die mit einer

aus demselben Material gefertigten Schraube S gegeneinandergedreht werden. Zwischen die beiden Kompartimente, deren Preßstellen zuvor mit Vaseline bestrichen werden, wird die Stützfolie F geklemmt. Sie besitzt einen Durchmesser von 12 mm. Es wird eine biaxial gestreckte, 2 μm dicke, Polyethylenfolie der Fa. Hoechst benutzt (Hostaphan RE2), die auch zur Herstellung von Folienkondensatoren benutzt wird. Damit werden Kapazitäten von 1400-1800 pF erhalten. Zur Durchführung von Doppelblitzexperimenten wird der Durchmesser, mit Hilfe von zwei Teflon Lochblenden (B_1 und B_2), die zusätzlich zwischen die beiden Kompartimente geklemmt werden, auf 5 mm reduziert. Dadurch sinkt zwar die Kapazität auf 300 pF, aber es wird mit beiden Lasersystemen eine homogene Ausleuchtung dieser reduzierten Folienfläche erzielt.

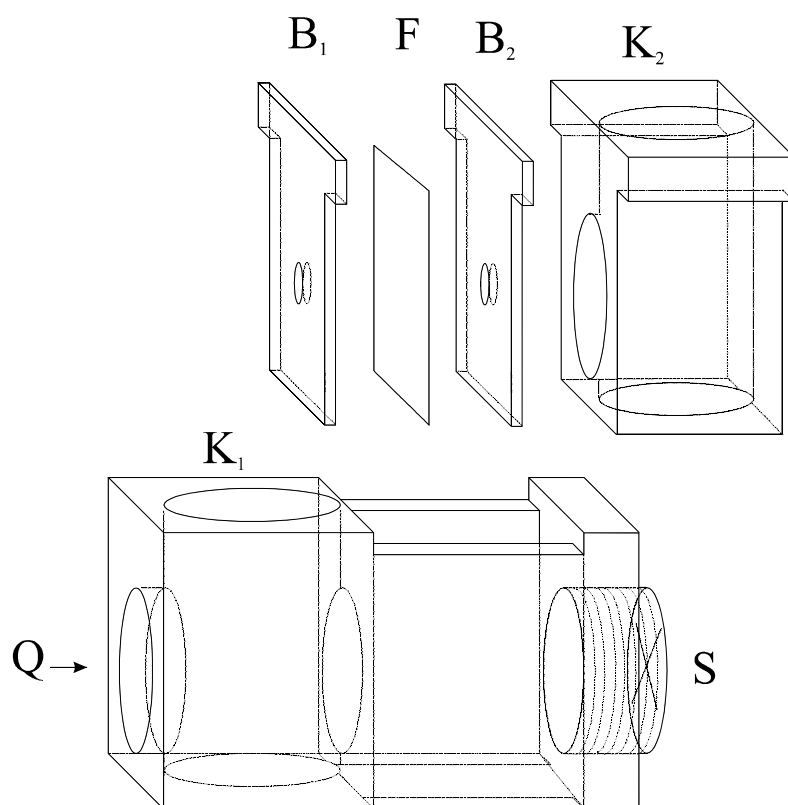


Abb. 2.6 Skizze der Küvette für elektrische Messungen. Durch das Quarzfenster Q gelangt der Laserstrahl in das Innere der Küvette. Die oben abgebildeten Komponenten B_1 , F , B_2 und K_2 werden in die Aussparung des unten abgebildeten Küvettenteils eingesetzt und mit der Spannschraube S fest zusammengepreßt. Die Folie F wird dann auf der rechten Seite mit einer Lipidschicht imprägniert. Später werden dann die beiden Kompartimente K_1 und K_2 mit der Elektrolytlösung gefüllt. Die Folie F isoliert dann die beiden Kompartimente gegeneinander ab. Nach Zugabe von Purpormembranen in das Kompartiment K_2 erfolgt die orientierte Anlagerung an die imprägnierte Folie. Zur Messung der Spannung werden zwei Platinelektroden direkt in die Kompartimente K_1 und K_2 eingeführt.

Nach dem Einspannen der Folie, wird die dem Laserstrahl abgewandte Seite der Folie mit 5 μl einer Lösung aus 1,2% (Masse/Volumen) Diphytanoylphosphatidylcholin (Avanti Lipids) und 0,025% Octadecylamin in Dekan bestrichen. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels (in etwa einer Stunde) befindet sich eine Lipidschicht auf der Stützfolie. Dabei sorgt das Octadecylamin für eine positive Oberflächenladung. Nun werden beide Kompartimente vorsichtig mit einer Lösung von 150 mM KCl-Salz und je 3 mM Tris, HEPES (Sigma Chemical Company) und Natriumacetat Puffer gefüllt. Dann werden 40 μl der mit 5 mg/ml konzentrierten Purpormembranvorratslösung mit derselben Menge der Elektrolytlösung in einem kleinen Gefäß vermischt und 20 s einem Ultraschallbad ausgesetzt, damit sich die eventuell aggregierten Membranen auflockern. Diese Suspension wird dann der Elektrolytlösung in dem Kompartiment hinzugemischt, dessen Folienseite zuvor imprägniert wurde. Aufgrund des statischen Dipolmomentes der Purpormembranen lagern diese sich nun mit der extrazellulären Seite an die mit Lipid imprägnierte Stützfolie an. Der Anlagerungsvorgang findet bei Raumtemperatur im Dunkeln und pH 7-8 statt und dauert mindestens 120 min. In der Regel wurde die Probe am Vortag der Messung vorbereitet, damit während der Messung keine Veränderung der Signalhöhe durch weitere Anlagerung

stattfindet. Die Kapazität der Meßküvette wird mit einem Multimeter gemessen, und mit einem weiteren Multimeter (Voltcraft Modell 5050E) mit FET-Eingang wird die Küvette auf Dichtigkeit bis $1\text{ G}\Omega$ überprüft. Nach Einbau der Küvette in den Küvettenhalter und Einbringen der Elektroden muß noch mindestens eine Stunde gewartet werden, bis die Elektronik nicht mehr driftet.

Es erweist sich als vorteilhaft, zu Beginn einige Messungen der Probe bei 40°C durchzuführen, da dann die Amplitude noch etwas zunimmt. Vermutlich wird dadurch die Orientierung verbessert. Erst wenn die Amplitude konstant bleibt, wird die Meßreihe begonnen, und die interessierenden Parameter wie Temperatur oder pH werden variiert.

Der pH wird mit einem Digital pH-Meter (Knick Typ 647 mit Ingold Glaselektrode Modell Lot 405 M3) kontrolliert, die Titration erfolgt durch Zugabe von kleinen Mengen 1 N NaOH bzw. $1\text{ N H}_2\text{SO}_4$.

2.8 Die Blitzlichtspektroskopie

Die Blitzlichtapparatur gleicht der oben beschriebenen elektrischen Apparatur (Abb. 2.3) sehr stark. So erfolgt die Steuerung des Meßablaufs, exakt wie bei der elektrischen Apparatur, mit einem PC, und auch die Datenaufnahme erfolgt in zwei Kanälen, bestehend aus einem schnellen Oszilloskop und einer Einsteckkarte. Auch die logarithmische Reduzierung der Daten und die Mittelung über mehrere Messungen erfolgt ebenso wie bei den elektrischen Messungen. Außerdem wurde auch die Möglichkeit geschaffen, ebenso wie bei der elektrischen Messung, mit einem Delaygenerator Doppelblitzexperimente durchzuführen, und mit Hilfe von Photodioden die Datenaufnahme wahlweise auf Einsetzen des ersten oder des zweiten Blitzes zu starten. Aufgrund dieser starken Ähnlichkeit wird in Abb. 2.7 nur der optische Teil der Blitzlichtapparatur gezeigt.

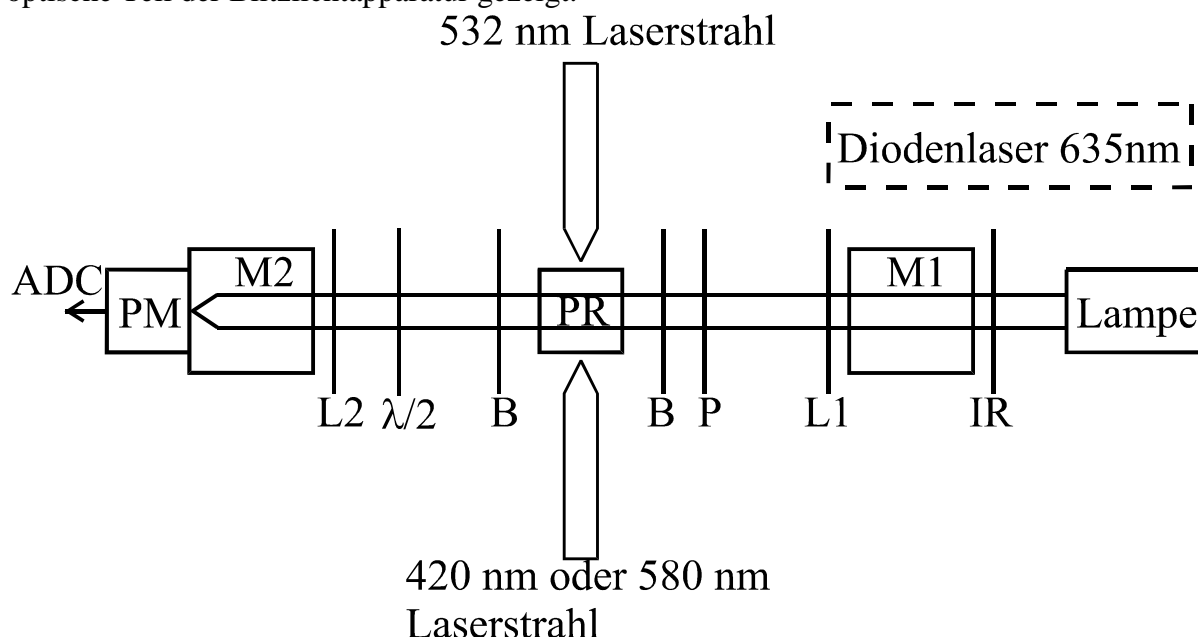


Abb. 2.7 Schematische Anordnung des Meßlichtstrahlengangs in der Blitzlichtapparatur. M1, M2 Monochromator, B Blende, P Polarisator, L1, L2 Linsen, PM Photomultiplier, IR Infrarotfilter, PR Probe, ADC Datenaufnahme. Der Diodenlaser dient als alternative Meßlichtquelle.

Als Meßlichtquelle kann entweder eine 100 W Halogenlampe oder eine Quecksilberbogenlampe (Müller Elektronik, Modell XH 100) benutzt werden. Das Meßlicht wird nach Durchgang durch den Monochromator M1 mit einer kurzbrennweitigen Linse parallelisiert und mit einem Polarisator vertikal polarisiert. Danach wird der homogene Kern des Meßlichtstrahls (ca. 3-4 mm Durchmesser) ausgeblendet, und nur dieser Teil durchleuchtet

dann die Probe. Danach gelangt das Meßlicht durch Blende, $\lambda/2$ -Plättchen und Linse in den Monochromator M2. Zur besseren Unterdrückung des Streulichtes des Anregungslasers wurde ein schmalbandiger Doppelmonochromator (Jobin Yvon H10 D) verwendet. Das $\lambda/2$ -Plättchen dient dazu, die vertikale Polarisation des Meßlichts um 90° zu drehen, da der Monochromator für horizontale Polarisation empfindlicher ist. Das Signal des Photomultipliers wird verstärkt (dazu wurde der Verstärker durch einen mit höherer Bandbreite (Analog Devices 9610) ersetzt) und dann von einem Datenaufnahmesystem, bestehend aus einem schnellen und einem langsamen Digitalisierungskanal, aufgezeichnet. Im Unterschied zur elektrischen Messung, bei der die Spannung direkt die interessierende Meßgröße ist, wird bei der optischen Messung die Intensität des Meßlichtes nach Durchgang durch die Probe vor der Blitzanregung ($I(t < 0)$) und danach für jeden Zeitpunkt ($I(t)$) gemessen. Hieraus wird die Absorptionsänderung ΔA nach Gl. 2.5 berechnet und gespeichert. Mit dieser Anordnung wird bei einer einzigen Wellenlänge der Zeitverlauf der Absorptionsänderung gemessen, anders als etwa bei OMA-Systemen, die es erlauben den spektralen und zeitlichen Verlauf gleichzeitig zu messen.

Mit der Halogenlampe werden Messungen im ganzen sichtbaren Spektralbereich mit hoher zeitlicher Stabilität über den gesamten Zeitbereich durchgeführt. Nachteilig ist, daß die Lichtintensität mit dieser Lampe bei einer Wellenlänge sehr gering ist (ca. $30 \mu\text{W}$ nach M1 mit einer Bandbreite $\Delta\lambda$ von 8 nm), man erhält nur ein schlechtes Signal-Rauschverhältnis im ns- μs Zeitbereich. Ein weiteres Problem besteht darin, daß die Membranbruchstücke der Probe das Blitzlicht des Lasers stark streuen und außerdem fluoreszieren. Dieses Streulicht wird von der Linse zusammen mit dem Meßlicht in den Monochromator fokussiert. Da der Monochromator dieses Streulicht nicht vollkommen unterdrückt, wird der Rest davon vom Photomultiplier detektiert, was zu einem sog. „Blitzdurchschlag“ im Zeitbereich $< 1 \mu\text{s}$ führt. Um dieses Artefakt zu eliminieren, kann mit einer intensiveren Lichtquelle gearbeitet werden, die so stark ist, daß das Streulicht des Lasers vernachlässigbar wird. Dabei ist es vorteilhaft auch eine möglichst schmalbandige Lichtquelle zu benutzen, dadurch kann man engere Spalten im Monochromator M2 benutzen, wodurch die Streulichtunterdrückung ebenfalls besser wird. Als starke schmalbandige Lichtquelle wird die 406 nm Linie einer Quecksilberbogenlampe benutzt. Dadurch ist es möglich, bei dieser Wellenlänge Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung durchzuführen. Alternativ zur Lampe mit nachgeschaltetem Monochromator kann auch ein Diodenlaser bei 635 nm benutzt werden (Laser 2000, Modell APM01/1457), um ebenfalls eine höhere zeitliche Auflösung zu erhalten. Dabei ist jedoch zu beachten, daß das Meßlicht nicht zu stark sein darf, damit sich nur ein unwesentlicher Anteil der Moleküle ($< 3\%$) in einem photostationären Photogleichgewicht befindet. Durch die Kombination dieser Modifikationen erhält man bei Messungen mit dem Diodenlaser eine Anstiegszeit von etwa 20 ns für die Entstehung des K-Intermediates.

Ein Problem bei der Durchführung von Doppelblitzexperimenten besteht nun darin, daß die Membranbruchstücke im allgemeinen durch Rotationsdiffusion ihre Orientierung ändern. Möchte man nun Doppelblitzexperimente mit variierendem Zeitabstand zwischen den beiden Blitzen durchführen, so sind die Moleküle zur Zeit des zweiten Blitzes in einer anderen Orientierung als zur Zeit des ersten Blitzes. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Membranbruchstücke in einem 10% Polyacrylamidgel immobilisiert, so daß unabhängig vom Zeitabstand beide Blitze auf gleich orientierte Moleküle treffen.

Um aber auch Titrations in Suspension durchzuführen zu können, oder für Messungen an Mutanten, die wegen der geringen Menge an Probenmaterial keine Gelherstellung erlauben, wurde der in Abb. 2.8 abgebildete Strahlengang benutzt. Hier wird der erste Blitz (frequenzverdoppelter Nd:YAG Laser) so auf die Probe gelenkt, daß für alle drei Polarisationsrichtungen dieselbe Intensität erreicht wird. Dadurch erreicht man eine isotrope Verteilung der angeregten Moleküle, die auch nach Rotationsdiffusion isotrop bleibt. Daher

wird auch bei Doppelblitzexperimenten, unabhängig vom Zeitabstand, der zweite Blitz immer auf dieselbe isotrope Verteilung von angeregten Molekülen treffen. Der zweite Blitz (Farbstofflaser) ist vertikal polarisiert, so daß man bei ebenfalls vertikal polarisiertem Meßlicht die größten Absorptionssignale erhält.

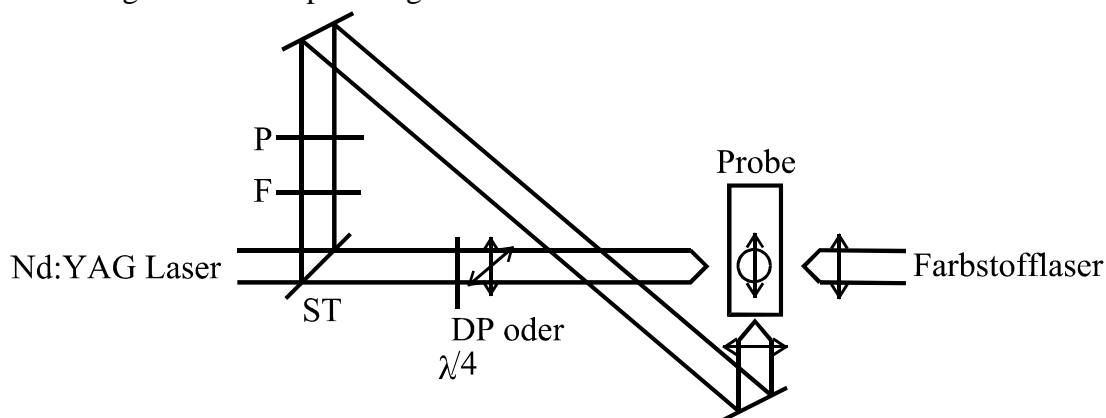


Abb. 2.8 Der Anregungsstrahlengang der beiden Laser. Am Strahlteiler ST wird der Teil der Intensität des Nd:YAG Laserstrahls abgezweigt, der die Probe von unten anregt. Der durchgehende Strahl wird entweder mit einem Depolarisator depolarisiert, oder mit einem $\lambda/4$ -Plättchen zirkular polarisiert. Mit dem Neutralglasfilter F wird die Anregungsintensität von unten so eingestellt, daß sich dieselbe Anregung für alle drei Raumrichtungen ergibt. Der Farbstofflaserstrahl ist immer vertikal polarisiert. Die Richtung des Meßlichtstrahls ist senkrecht zur Zeichenebene und seine Polarisationsrichtung ist vertikal wie angegeben. Dieser Aufbau wird in der Arbeitsgruppe auch für andere polarisierte Messungen verwendet (Otto et al., 1995).

2.9 Auswertemethoden und Fehlerbetrachtung

Ein Problem bei der Anpassung der elektrischen Zeitspuren mit Exponentialfunktionen ist, daß mit steigendem Signal-Rauschverhältnis immer mehr Exponentialfunktionen zur Anpassung der Daten erforderlich werden. Die Steigerung des Signal/Rauschverhältnisses wurde durch diverse Verbesserungen an der Apparatur durch Generationen von Experimentatoren erzielt. Die Reproduzierbarkeit der Parameter dieser Exponentialfunktionen bei Messungen an unterschiedlichen Anlagerungen ist sehr schlecht (Holz, 1990). Daher wurde eine gröbere Beschreibung gesucht, die die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Meßreihen erhöhte. M. Holz testete dazu eine Reihe von Verteilungen von Exponentialfunktionen aus, etwa Potenzgesetze, Gauß-Verteilungen oder kontinuierliche Verteilungen beliebiger Form, um die zeitaufgelösten Daten anzupassen. Als physikalische Ursache für die Existenz solcher verteilten Kinetiken können Subzustände angesehen werden. Diese Subzustände können sich zum Beispiel in der Struktur oder dem Protonierungszustand von Gruppen in einem Bereich unterscheiden, der nicht direkt bei dem Übergang betroffen ist, aber dennoch zu einer gewissen Energieaufspaltung der Ausgangs- und Endzustände führt. In einer Darstellung der Potentialkurve über der Reaktionskoordinate äußert sich das in einer gewissen Rauigkeit. Wenn die Verweildauer in den Subzuständen von vergleichbarer Größe der Dauer des betrachteten Übergangs ist, kommt es zu einer Aufspaltung der Aktivierungsenergien und damit zu einem kontinuierlichen Relaxationsspektrum. Bei höherer Temperatur, wenn die Fluktuationen zwischen den Subzuständen schneller erfolgen als die betrachtete Relaxation, wird man nur eine mittlere Aktivierungsenergie und damit eine reine Exponentialfunktion feststellen.

Auch durch die Aufladung der Membran, während der Relaxation, kann es zu einem kontinuierlichen Relaxationsspektrum kommen, denn die Rate des Übergangs wird dabei selbst zeitabhängig (siehe Kap. 4.2).

Besonders geeignet zur reproduzierbaren Beschreibung des i -ten Prozesses bei Bacteriorhodopsin erwiesen sich Gauß-verteilte Kinetiken von der Form (Holz, 1990)

$$U(U_0^i, k_0^i, \sigma^i, t) = \frac{U_0^i}{\sigma^i \sqrt{2\pi}} \int_{-1}^7 e^{-\frac{1}{2} \frac{\log k_0^i - \log k}{\sigma^i}} e^{-kt} d(\log k) \quad \text{Gl. 2.34}$$

Dabei ist σ^i die Breite der Gauß-Verteilung bis zum Abklingen auf $\frac{1}{\sqrt{e}} \approx 0,61$ des Maximalwertes. Für die hier untersuchten Prozesse wurden Integrationsgrenzen gewählt, die Raten von $0,1 \text{ s}^{-1}$ bis 10^7 s^{-1} entsprechen. Zur Auswertung einzelner Zeitspuren wurde von M. Holz ein FORTRAN-Programm entwickelt, das eine Anpassung an die Meßwerte mit einer Summe aus bis zu 15 reinen Exponentialfunktion und bis zu 5 Gauß-verteilten Kinetiken und einem Offset durchführt. Dabei werden die Zeitkonstanten und bei verteilten Kinetiken zusätzlich die Breiten der Verteilungen vorgegeben. Das Programm schätzt daraus die zugehörigen Amplituden ab und startet dann damit eine Minimierung der Summe der quadratischen Abweichung mit der Methode nach Marquart. Dabei werden dann Zeitkonstanten, Amplituden, Breiten und der Offset variiert. Zur Anpassung der Systementladung (Kap. 2.3), werden zwei bis drei reine Exponentialfunktionen benutzt. Wahlweise errechnet das Programm aus den Zeitkonstanten der Systementladung ($\tau_{\text{sys1}} \equiv (k_{\text{sys1}})^{-1}$ und $\tau_{\text{sys2}} \equiv (k_{\text{sys2}})^{-1}$) und den Parametern des aktiven Schrittes ($U_0^i \text{ Fit}, \tau^i \equiv (k_0^i)^{-1}$) eine korrigierte Amplitude nach Gleichung Gl. 2.30:

$$U_0^i \text{ korr} = U_0^i \text{ Fit} \frac{(\tau^i - \tau_{\text{sys1}})(\tau^i - \tau_{\text{sys2}})}{\tau_{\text{sys1}} \tau_{\text{sys2}}} \quad \text{Gl. 2.35}$$

Bei einer aktiven Komponente die 20 mal schneller ist als die Systementladung beträgt die Korrektur weniger als 10 Prozent.

Der Fehler an den Parametern bei der Anpassung von typischen elektrischen Messungen liegt im Bereich von wenigen Prozent. Daher muß als absoluter Fehler vielmehr die Reproduzierbarkeit der Parameter in Wiederholungsmessungen an unterschiedlichen Membrananlagerungen angesehen werden, die manchmal sogar bis zu einem Faktor zwei in den Zeitkonstanten und bis zu 20% in den Amplituden abweichen können. Exakte Aussagen über die Parameter können nur mit erheblichem Aufwand getroffen werden, da eine Statistik über viele Anlagerungen betrieben werden muß (siehe Dissertation von M. Holz). Dieser Statistik von elektrischen Messungen wird in der vorliegenden Arbeit nicht nachgegangen. Um qualitative Aussagen über die Funktion zu machen, ist es geschickter gewisse physikalische Parameter wie pH, Temperatur, etc. in einer Meßreihe an derselben Anlagerung zu variieren. Die Zeitspuren dieser Meßreihe sind dann sehr gut miteinander vergleichbar.

Häufig besteht die Problemstellung darin, einen Satz von Zeitspuren mit denselben Zeitkonstanten anzupassen. Dies sollte z.B. für die Zeitspuren der optischen Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen gelten (Kap. 2.1, Gl. 2.9). Für diese Fragestellung existiert in der Arbeitsgruppe das FORTRAN-Programm „mupw7“, das es erlaubt eine simultane Anpassung an einen Satz von Zeitspuren mit einer Summe von Exponentialfunktionen durchzuführen, wobei für alle Zeitspuren $F^i(t)$ dieselben Raten k_j , aber unterschiedliche Amplituden f_j^i erhalten werden. Man spricht daher von einer „globalen Anpassung“ an einen Satz von Zeitspuren.

$$F^i(t) = \sum_{j=1}^n f_j^i e^{-k_j t} \quad \text{Gl. 2.36}$$

Bei der globalen Anpassung der optischen Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen liefern die Amplituden einer Zeitkonstante z.B. das Amplitudenspektrum

$B_j(\lambda)$ des Übergangs (siehe Gl. 2.9). Aber auch bei Meßreihen bei denen ein anderer Parameter variiert wird, wie z.B. der Zeitabstand der Doppelblitze (Kap. 5.3.1), hat dies den Vorteil, daß die Amplituden unterschiedlicher Zeitspuren besser verglichen werden können, da auch das Problem der Zuordnung der Zeitkonstanten, das man häufig bei Einzelanpassungen hat, entfällt.

Einige Auswertungen wurden mit Hilfe des kommerziellen Programms Origin durchgeführt. Dieses Programm ermöglicht, Meßwerte graphisch darzustellen und außerdem Anpassungen von beliebigen Funktionen an die Meßwerte durchzuführen.