

## 2. Theoretische Grundlagen und Methoden

### 2.1 Theoretische Grundlagen

#### 2.1.1 Wechselwirkung zwischen Licht und Materie

Die Absorption von Licht ist die Voraussetzung für alle nachfolgenden photophysikalischen und photochemischen Prozesse. Sie wird im Absorptionsspektrum der Moleküle deutlich. Absorbierte Lichtintensität, energetische Lage und Breite der Absorptionsbanden sind dabei für die einzelnen Moleküle typisch. Deshalb können diese Informationen zur Strukturaufklärung von chemischen Verbindungen genutzt werden.

Entsprechend dem Welle-Teilchen-Dualismus kann Licht sowohl als Welle wie auch als Teilchenstrom aufgefasst werden. Nach der klassischen Maxwellschen Wellentheorie können wir deshalb das Licht als elektromagnetische Welle beschreiben, die sich mit der Phasengeschwindigkeit ( $c$ ) ausbreitet:

$$c = \nu \times \lambda \quad (2.1)$$

Dabei charakterisieren  $\nu$  als Frequenz die zeitliche und  $\lambda$  als Wellenlänge die räumliche Periodizität der Oszillatoren des elektromagnetischen Feldes. Elektromagnetische Wellen werden durch oszillierende Ladungsverschiebungen erzeugt. Bei einem Absorptionsvorgang ist es genau umgekehrt. Hier wird eine Ladungsverschiebung durch die Absorption einer elektromagnetischen Welle hervorgerufen. Hierbei ist zu beachten, dass die Energiezustände in Atomen und Molekülen quantisiert sind. Entspricht die Energie eines auf ein Atom oder Molekül auftreffenden Photons genau der Energiedifferenz zweier solcher Zustände, so kann die elektromagnetische Strahlung ein Elektron von einem in ein anderes Energieniveau überführen (Resonanzbedingung).

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \times \nu = h \times c / \lambda \quad (2.2)$$

Allerdings setzt sich die Energie eines Moleküls nicht nur aus dem Anteil der Elektronen zusammen, sondern sie enthält auch Anteile der Schwingungen, der Rotation und der Spins der Atomkerne und Elektronen. Für die Gesamtenergie kann man also näherungsweise schreiben:

$$E = E_{elek} + E_{vib} + E_{rot} + E_{spin} \quad (2.3)$$

Damit überhaupt ein Übergang zwischen zwei Energieniveaus möglich wird, muss der untere Zustand, aus dem die Energieaufnahme erfolgen soll, besetzt sein. Die Besetzung der Energieniveaus ist temperaturabhängig und durch die Boltzmann-Verteilung gegeben:

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\Delta E / k_B T} \quad (2.4)$$

T - Temperatur in Kelvin,  $k_B$  – Boltzmann Konstante,  $N_{1,2}$  Besetzungszahlen der Energieniveaus

Je größer die Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen den Niveaus ist, desto geringer ist der obere Zustand besetzt. Umgekehrt nimmt mit steigender Temperatur die Besetzung höherer Niveaus zu. Für die Überwindung von  $\Delta E$  des Rotationsniveaus reicht in der Regel die thermische Energie der Umgebung aus (2,5 kJ/mol bei RT), während schon bei den Schwingungszuständen in der Regel nur der unterste Zustand besetzt ist (30 kJ/mol). Bei den elektronischen Niveaus beträgt der Abstand schon einige hundert kJ/mol. Für die Kern-Spinumkehr hingegen gilt nahezu Gleichbesetzung der Energieniveaus, und die Energiedifferenzen sind sehr klein, weshalb die Übergänge schon von langwelligen Radiowellen induziert werden können (NMR-Spektroskopie).

### 2.1.2 Elektronische Energieniveaus

Die Energieniveaus der Moleküle werden durch Molekülorbitale (MOs) beschrieben. Bindende MOs sind in der Regel mit zwei Elektronen besetzt, wohingegen antibindende MOs\* leer sind. Einen Sonderfall stellen die nichtbindenden MOs (n) dar. Sie tragen in der Regel nicht zur Bindung bei und haben oft den Charakter von Atomorbitalen.

Bei der Diskussion von chemischen, photochemischen und photophysikalischen Prozessen ist es oft ausreichend, lediglich die höchsten besetzten (HOMO – Highest occupied molecular orbital) und die energetisch niedrigsten besetzten (LUMO – Lowest unoccupied molecular orbital) MOs zu berücksichtigen. MOs unterscheiden sich in ihrer Symmetrie. So sind  $\sigma$ -MOs, die in Molekülen Einfachbindungen beschreiben, rotationssymmetrisch bezüglich der Bindungslinie, während die  $\pi$ -Orbitale der Doppel- und Dreifachbindungen eine Knotenebene aufweisen. Wird ein Elektron durch Absorption elektromagnetischer Strahlung angeregt, so wird es von einem besetzten MO in ein leeres  $\sigma^*$ - oder  $\pi^*$ -MO angehoben. Die Übergangsenergie richtet sich dabei nach den Abständen der beteiligten MOs. So wird die größte Energie für Übergänge zwischen zwei  $\sigma$ -Orbitalen benötigt ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ). Da  $\sigma$ -Orbitale in Molekülen Einfachbindungen beschreiben, geht ein solcher Übergang mit dem Aufbrechen der Bindung und damit mit der Destruktion des Moleküls einher. Die geringsten Energien werden hingegen für  $n \rightarrow \pi^*$ - und  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge benötigt. Dabei nimmt die für den Übergang erforderliche Energie mit zunehmender Ausdehnung des  $\pi$ -Elektronensystems ab. Das  $\pi$ -Elektronensystem wird durch überlappende  $p_z$ -Orbitale von  $sp^2$  hybridisierten Kohlenstoffatomen gebildet und erstreckt sich über das gesamte konjugierte System. Die Elektronenwellenfunktion ist dabei nicht mehr einem speziellen Atom zugeordnet, so dass man von einem delokalisierten Elektronensystem (oder hier von einem  $\pi$ -Elektronensystem) spricht. Das  $\pi$ -Orbital kann dabei als Potenzialkasten mit der Breite  $L$  betrachtet werden. Die Energieniveaus dieses Potentialkastens sind

$$E_n = \frac{h^2}{2m_e L^2} \times n^2 \quad (2.5)$$

Damit beträgt die Energie des Überganges  $n \rightarrow n'$

$$\Delta E_{n,n'} = \frac{h^2}{2m_e L^2} \times ((n')^2 - n^2) \propto \frac{1}{L^2} \quad (2.6)$$

Dies entspricht der Wellenlänge

$$\lambda_{n,n'} = \frac{2m_e c}{h} \times L^2 \propto L^2 \quad (2.7)$$

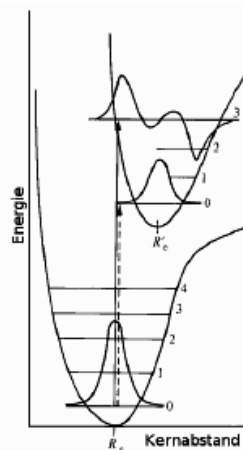
Durch Verlängerung des konjugierten Systems wird die Übergangsenergie also kleiner und die Absorptionsbande wird zu größeren Wellenlängen, also in den roten Wellenlängenbereich verschoben.

### 2.1.3 Absorption von Licht

Die Absorption ist ein sehr schneller Vorgang ( $\approx 10^{-15}$ s). Damit ein Molekül mit einem elektromagnetischen Feld wechselwirken kann, muss es ein Dipolmoment besitzen, das mit der Frequenz des eingestrahlten Lichts schwingen kann. Für den Übergang zwischen Wellenfunktionen  $\Psi_a$  und  $\Psi_b$  ist das Übergangsdipolmoment definiert durch:

$$\vec{\mu}_{ba} = -e \int \Psi_b^* \times \vec{r} \times \Psi_a d\tau \quad (2.8)$$

Die Intensität des Übergangs ist proportional zum Quadrat des Übergangsdipolmomentes. Durch die Berechnung des Übergangsdipolmomentes  $\vec{\mu}_{ba} \neq 0$  werden unter anderem die spektroskopischen Auswahlregeln erhalten. In gelösten Proben kommt es auf Grund von Kopplungseffekten zu einer nicht aufgelösten Schwingungsstruktur, die zu einer Linienverbreiterung und somit zu einer breiten Absorptionsbande führt. Die Grobstruktur einer Bande wird durch das Franck-Condon-Prinzip erklärt, das besagt, dass elektronische Übergänge bei unveränderten Kernkoordinaten in den Franck-Condon-Zustand erfolgen, der nicht dem Gleichgewichtszustand des neuen elektronischen Zustandes entsprechen muss. Da sich der Kernabstand während elektronischer Übergänge kaum ändert, kann der Übergang (Absorption von Licht) zwischen zwei elektronischen Zuständen in Potentialdiagrammen mit einer senkrechten Linie gekennzeichnet werden (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Elektronischer Übergang nach dem Franck-Condon-Prinzip**

Der Übergang vom Grundzustand in den elektronisch angeregten Zustand wird durch eine senkrechte Linie gekennzeichnet.

Entspricht der Franck-Condon-Zustand nicht der Gleichgewichtskonfiguration des elektronischen Zustandes, was in der Regel der Fall sein wird, so erfolgt eine Relaxation in einen stabilen Gleichgewichtszustand über langsame Kernbewegungen (siehe Abbildung 2.1). Die Intensität (Wahrscheinlichkeit) eines Überganges ist dann am höchsten, wenn die Überlappung der Wellenfunktionen vor und nach der Anregung am größten ist.

Die Grundlage für eine quantenmechanische Beschreibung des Franck-Condon-Prinzips ist das Übergangsdipolmoment aus Gleichung (2.8). Mit Hilfe der Born-Oppenheimer-Näherung kann man die vollständigen Wellenfunktionen des Anfangs- und Endzustandes als Produkt der elektronischen und vibronischen Wellenfunktionen schreiben. Die vollständige Wellenfunktion für einen elektronischen Zustand  $\varepsilon$  im Schwingungszustand  $\nu$  ist demnach  $\Psi_\nu(\vec{R}) \times \Psi_\varepsilon(\vec{r})$ , wobei  $\vec{r}$  die Koordinaten der Elektronen und  $\vec{R}$  die Koordinaten der Kerne sind. Für die Anregung  $\varepsilon, \nu \rightarrow \varepsilon', \nu'$  lautet das Übergangsdipolmoment:

$$\begin{aligned} \vec{\mu}_{ba} &= -e \int (\Psi_{\varepsilon'}(\vec{r}) \times \Psi_{\nu'}(\vec{R}))^* \times \vec{r} \times (\Psi_\varepsilon(\vec{r}) \times \Psi_\nu(\vec{R})) d\tau_{Elek} d\tau_{Kern} \\ &= -e \int (\Psi_{\varepsilon'}^*(\vec{r}) \times \vec{r} \times (\Psi_\varepsilon(\vec{r})) d\tau_{Elek} \times \int \Psi_{\nu'}^*(\vec{R}) \times \Psi_\nu(\vec{R}) d\tau_{Kern} \end{aligned} \quad (2.9)$$

Das zweite Integral wird als Überlappungsintegral bezeichnet. Da die Intensität vom Quadrat des Übergangsdipolmomentes abhängt, nennt man das Quadrat des Überlappungsintegrals auch

Franck-Condon-Faktor des Überganges  $\varepsilon, \nu \rightarrow \varepsilon', \nu'$ . Die Intensität der Absorptionsbanden ist also proportional zum Überlapp der Wellenfunktionen.

### 2.1.4 Lambert-Beer-Gesetz und Oszillatorstärke

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 Extinktionskoeffizienten  $\alpha(\lambda)$ :

$$dI = -\alpha(\lambda)c(x)I(x)dx \quad (2.10)$$

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

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon(\lambda)cd} \quad \text{mit} \quad \varepsilon(\lambda) = \frac{\alpha(\lambda)}{\ln 10} \Leftrightarrow A(\lambda) \equiv \varepsilon(\lambda)cd = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2.11)$$

$\varepsilon(\lambda)$  wird Extinktionskoeffizient genannt, seine Wellenlängenabhängigkeit legt das Absorptionsspektrum der Spezies fest, seine Einheit ist  $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . 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 die Differenzmessung zu einer Lösungsmittelprobe in einem Zweistrahlphotometer (Shimadzu UV2102 PC und Shimadzu UV260), wodurch die Notwendigkeit  $I_0$  zu messen entfällt.

Der Zusammenhang zwischen der makroskopischen Größe der Extinktion und dem quantenmechanischen Übergangsdipolmoment (Gl. 2.5) erfolgt über die Oszillatorstärke  $f_{ba}$ :

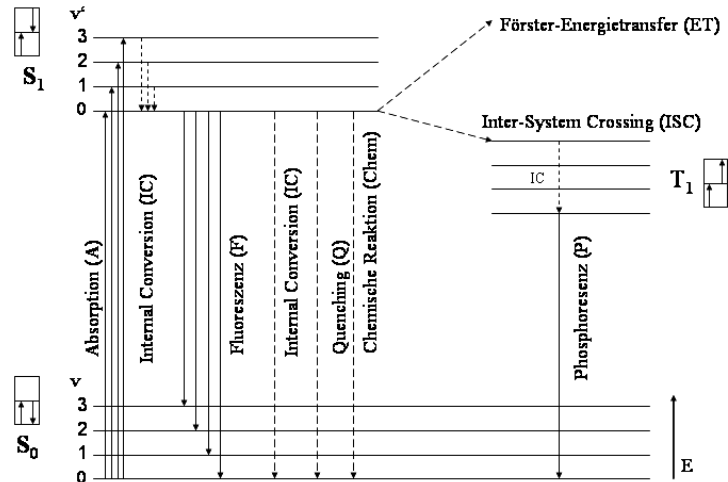
$$f_{ba} = \text{konst.} \left| \mu_{ba}^{-el} \right|^2 = \frac{4\varepsilon_0 m_e c^2 \ln 10}{N_A e^2} \times \int \varepsilon(\nu) d\nu \quad (2.12)$$

$\varepsilon_0$ -elektrische Feldkonstante  
 $m_e$ -Elektronenmasse  
 $N_A$ -Avogadro-Konstante  
 $e$ -Elementarladung  
 $\varepsilon(\nu)$ -Extinktionskoeffizient)

Dabei wird die Konstante so gewählt, dass für einen erlaubten Übergang in einem Zwei-Zustandssystem die Oszillatorstärke den Wert eins besitzt. Die Oszillatorstärke eines Übergangs kann weiterhin aus der Fläche unter dem frequenzabhängigen Absorptionssignal berechnet werden (Gl. 2.12).

### 2.1.5 Desaktivierung des angeregten Zustandes

Die Absorption von Photonen hebt ein Elektron vom Grundzustand ( $S_0$ ) in den angeregten Zustand ( $S_1$ ). Für die Desaktivierung eines angeregten Zustandes gibt es verschiedene Kanäle die im Jablonski Diagramm von Abbildung 2.2 zusammengefasst sind.



**Abbildung 2.2: Jablonski Diagramm**

Energienivauschema eines Systems aus zwei Elektronen (nach Winter & Noll, 1998). Der Grundzustand  $S_0$  besitzt zwei Elektronen mit entgegengesetztem Spin. Bei Anregung in den nächst höheren elektronischen Zustand kann die Spinorientierung entweder erhalten bleiben ( $S_1$ ) oder sich umkehren ( $T_1$ ), wobei letzteres sehr selten ist. Bei Raumtemperatur erfolgt die Absorption fast ausschließlich aus dem Schwingungsgrundzustand ( $v=0$ ). Mögliche Desaktivierungswege nach der Absorption (A) eines Photons sind: Interkombinationsübergang (ISC), Inne-re Umwandlung (IC), Fluoreszenz (F), Phosphoreszenz (P), Förster-Energietransfer (ET), Quenching (Q) und chemische Reaktionen (Chem).

### 2.1.6 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Phytochrom durchläuft nach Blitzanregung eine Abfolge von Intermediaten, die sich in ihren Absorptionsspektren unterscheiden. Dabei muss es sich nicht unbedingt um einen reinen Folgezyklus handeln, sondern auch Rückreaktionen und Verzweigungen sind denkbar. Die Absorption des zeitabhängigen Gemisches der verschiedenen Spezies  $i$  ist zeit- und wellenlängenabhängig:

$$A(\lambda, t) = \sum_{i=0}^n \varepsilon_i(\lambda) \times c_i(t) \times d \quad (2.13)$$

Dagegen liegt das Phytochrom vor der Blitzanregung nahezu vollständig in der  $P_r$  Form vor, und somit:

$$A(\lambda, t < 0) = \varepsilon_p(\lambda) \times c_0 \times d \quad (2.14)$$

Die zeitaufgelösten Absorptionmessungen werden bei fester Wellenlänge  $\lambda$  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:

$$\Delta A(\lambda, t) = A(\lambda, t) - A(\lambda, t < 0) = \log_{10} \frac{I(\lambda, t < 0)}{I(\lambda, t)} \quad (2.15)$$

Dadurch ist die Messung der Intensität  $I_0$  vor der Probe nicht notwendig. Die absolute zeitaufgelöste Absorption  $A(\lambda, t)$  ergibt sich durch hinzuaddieren der Absorption vor der Anregung, die etwa durch die Messung im Spektralphotometer erhalten wird. Um die Wellenlängenabhängigkeit zu erhalten, müssen Messungen bei mehreren verschiedenen Wellenlängen durchgeführt werden.

Mit Gl. 2.13 und 2.14 lässt sich die gemessene Absorptionsänderung durch die Konzentrationsverläufe ausdrücken.

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=0}^n \varepsilon_i(\lambda) \times c_i(t) \times d - \varepsilon_p(\lambda) \times c_0 \times d \quad (2.16)$$

Unter Berücksichtigung, dass die Teilchenzahl und damit auch die Konzentration erhalten bleiben muss, gilt zu jeder Zeit  $c_0 = \sum_{i=0}^n c_i(t)$ ;

mit  $\varepsilon_p \equiv \varepsilon_0$  erhält man:

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=0}^n (\varepsilon_i(\lambda) - \varepsilon_p(\lambda)) \times c_i(t) \times d \quad (2.17)$$

Das bedeutet, dass sich die zeitaufgelösten Absorptionsänderungen 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 Fall, dass sich die Kinetik durch eine Differentialgleichungssystem 1. Ordnung beschreiben lässt (Kapitel 2.1.7), ist der Konzentrationsverlauf der Intermediate in folgender Form darstellbar:

$$c_i(t) = \sum_{j=1}^n a_{ij} e^{-k_j t} \quad (2.18)$$

Damit lässt sich Gl. 2.17 umschreiben in die Form:

$$\Delta A(\lambda, t) = d \sum_{j=1}^n \sum_{i=0}^n a_{ij} (\varepsilon_i(\lambda) - \varepsilon_p(\lambda)) \times e^{-k_j t} \equiv d \sum_{j=1}^n B_j(\lambda) \times e^{-k_j t} \quad (2.19)$$

Das bedeutet, dass sich die Kinetik bei jeder Wellenlänge durch denselben Satz von Raten  $k_j$  beschreiben lässt. Anstelle der Raten  $k_j$  werden üblicherweise die apparenten Zeitkonstanten  $\tau_j = 1/k_j$  verwendet. Die dadurch definierten Amplitudenspektren  $B_j(\lambda)$  beinhalten die kinetischen Parameter  $a_{ij}$  und die Differenzspektren der Intermediate. Bei der Analyse der Kinetik 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 eine sequentielle Abfolge ohne Rückreaktion und weit auseinander liegenden Raten zugrunde gelegt wird. Unter diesen Voraussetzungen, wird der Konzentrationsverlauf jedes Intermediates mit jeweils nur einer Aufbau- und Zerfallsrate und mit der Amplitude des anfänglich angeregten Grundzustandes  $c_0^*$  beschrieben. Damit vereinfachen sich Gl. 2.18 und 2.19 zu:

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

und

$$(2.20)$$

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

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 Intermediates  $\varepsilon_n(\lambda)$  gleich dem des Ausgangszustand  $\varepsilon_p(\lambda)$  ist, da sonst ein zeitlich konstanter Term übrig bleibt.

### 2.1.7 Reaktionskinetik

Die Geschwindigkeit einer Reaktion  $A+B \rightarrow C+D$  wird allgemein als Veränderung der Konzentration  $dc_x$  pro Zeiteinheit definiert

$$v = \frac{dc_x}{dt} \quad (2.21)$$

Nimmt die Konzentration ab ist das Vorzeichen negativ, bei Konzentrationszunahmen wird das Vorzeichen positiv.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration der Reaktionsteilnehmer wird mit der Reaktionsordnung beschrieben.

Für den Fall

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = kc_A \quad (2.22)$$

spricht man von einer Reaktion erster Ordnung und beim Fall

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = kc_A \times c_B \quad (2.23)$$

von einer Reaktion zweiter Ordnung.

Bei den thermischen Relaxationsprozessen der Kinetik von Phytochrom nach Lichtanregung kann man in erster Näherung von einer Kinetik erster Ordnung ausgehen.

Die mathematische Beschreibung erfolgt dann durch ein homogenes System gekoppelter linearer Differentialgleichungen:

$$dc_i(t)/dt = \sum_j k_{ij} \times c_j(t) \quad (2.24)$$

Die Komponenten des Spaltenvektors  $c_j(t)$  seien die relativen Konzentrationen der Intermediate zur Zeit  $t$ , und  $k_{ij}$  die Ratenmatrix, deren Einträge die mikroskopischen Raten für die Übergänge vom Intermediat  $j$  zum Intermediat  $i$  sind und damit das Reaktionsmodell definieren. Aus Gründen der Teilchenerhaltung müssen die Spalteneinträge die folgende Nebenbedingung erfüllen:

$$k_{ii} = -\sum_{j \neq i} k_{ij} \quad (2.25)$$

Für die Nichtdiagonalelemente müssen noch weitere Bedingungen erfüllt sein, die als Reziprozitätsbeziehung oder „law of detailed balance“ bezeichnet werden (Onsager 1931):

$$k_{ab}k_{bc}k_{ca} = k_{ac}k_{cb}k_{ba} \quad (2.26)$$

Die allgemeine Lösung der Differentialgleichung 2.24 erhält man (bei nicht entarteten Eigenwerten) durch eine Linearkombination der Eigenvektoren  $\vec{c}_{0i}$  der Ratenmatrix  $k_{ij}$  jeweils multipliziert mit einer Exponentialfunktion, die den Eigenwert  $(-k_i)$  als Argument besitzt.

$$c_i(t) = \sum_{j=1}^n a_{ij} e^{-k_j t} \quad (2.18)$$

Das bedeutet, dass im Allgemeinen zur Beschreibung der Konzentrationszeitspur eines einzelnen Intermediates sämtliche Raten des Zyklus benötigt werden.

### 2.1.8 Die Singulärwertzerlegung (SVD)

Die Anpassung der Absorptionsänderung  $\Delta A(\lambda, t)$  mit Exponentialfunktionen kann unter Umständen numerisch sehr aufwendig sein, insbesondere wenn eine große Anzahl von Wellenlängen in die Auswertung eingehen soll. Dabei ist aber ein Teil der Daten redundant. Eine Methode, große Datenfelder auf linear unabhängige Vektoren zu reduzieren, ist die Singulärwertzerlegung (engl. Singular Value Decomposition) (Hendler 1994, Dioumaev 1997). Dafür werden die Gleichungen 2.15 und 2.17 in Matrixschreibweise formuliert.

$$\Delta A = (A - A_n) \times c \quad (2.27)$$

Die Matrix  $\Delta A$  wird nun durch den SVD-Algorithmus in ein Produkt von Matrizen zerlegt:

$$\Delta A = U^T D(s) V \quad (2.28)$$

In der Diagonalmatrix  $D(s)$  stehen die so genannten Singulärwerte  $s$ , der Größe nach geordnet,  $U$  und  $V$  sind Matrizen mit orthonormalen Zeilenvektoren:

$$\sum_t V_{s,t} V_{s',t} = \delta_{s,s'} \quad \text{und} \quad \sum_\lambda U_{s,\lambda} U_{s',\lambda} = \delta_{s,s'} \quad (2.29)$$

Die Orthonormalitätseigenschaft gilt auch für die Spaltenvektoren der Pseudoinversen von  $U$  und  $V$ :

$$\sum_t V_{t,s}^{-1} V_{t,s'}^{-1} = \delta_{s,s'} \quad \text{und} \quad \sum_\lambda U_{\lambda,s}^{-1} U_{\lambda,s'}^{-1} = \delta_{s,s'} \quad (2.30)$$

Die Basisspektren werden durch die Spalten von

$$S = U^T D(s) \quad (2.31)$$

gebildet und die Zeilen von  $V$  sind die zugehörigen Zeitspuren. Bei Anwendungen auf die Kinetik von Agp1 sind i.a. nur drei oder vier Basisspektren relevant, so dass die weiteren, in denen das Rauschen steckt, weggelassen werden können. Damit ist in vielen Fällen schon eine erhebliche Datenreduktion erreicht.

Die Zeitspuren der relevanten SVD-Komponenten  $V_i(t)$  die mit den zugehörigen Singulärwerten  $s_i$  gewichtet wurden, werden dann simultan mit einer Summe von Exponentialfunktionen gefittet:

$$s_i V_i(t) = G_{i0} + \sum_j G_{ij} e^{-t/\tau_j} \quad (2.32)$$

Mit den aus dem Fit erhaltenen Amplituden  $G_{ij}$  und den Basisspektren  $U_i$  werden nun die Amplitudenspektren  $B_j$  berechnet:

$$B_j(\lambda) = \sum_i U_i(\lambda) G_{ij} \Leftrightarrow B = U^T G \quad (2.33)$$

Um eine Beziehung zwischen den Intermediatsspektren  $A$  und den Basisspektren  $S$  bzw. zwischen den Intermediatkonzentrationen  $c_i$  und den Basiszeitspuren  $V$  herzustellen, wird folgender Ansatz gemacht:

$$(A - A_n) = S X^{-1} \quad \text{und} \quad c_i = X V \quad (2.34)$$

Das heißt, es ist also eine Transformationsmatrix  $X$  zu finden. Dazu kommt unter anderem die so genannte „extrapolated difference method“ zum Einsatz, die von Dr. B. Borucki entwickelt und beim Photozyklus von Bacteriorhodopsin erfolgreich angewandt wurde (Borucki 1999). Dieses Gleichungspaar liefert natürlich noch keine eindeutige Lösung, doch die Anzahl der Unbekannten ist erheblich reduziert.



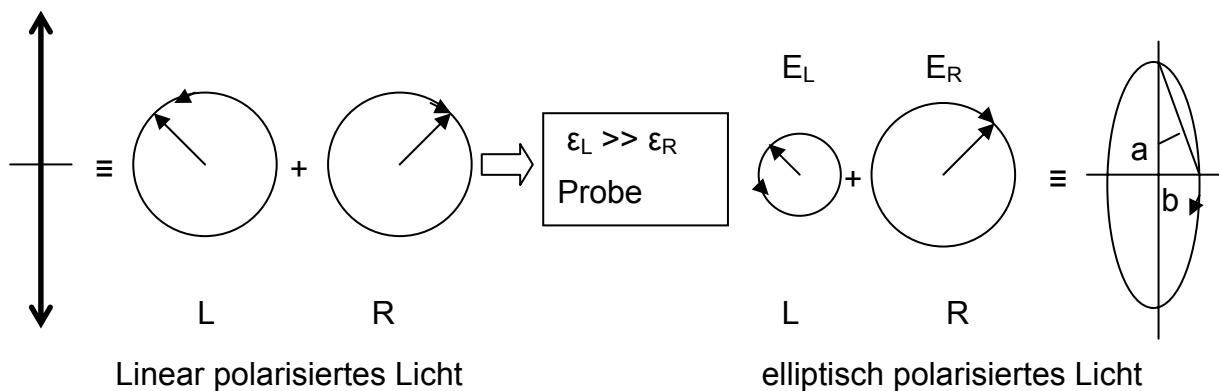
### 2.1.9 CD-Spektroskopie

Bei der CD-(Circular dichroism) Spektroskopie handelt es sich um eine chiroptische Meßmethode, bei der die Chiralität von Molekülen ausgenutzt wird. Voraussetzung für CD-Spektroskopie ist die optische Aktivität der Probe, d.h. die unterschiedliche Wechselwirkung mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht.

Linear polarisiertes Licht lässt sich als Überlagerung zweier zirkular (kreisförmig) polarisierter Lichtstrahlen mit gegenläufigen elektrischen Feldvektoren  $\vec{E}_L$  und  $\vec{E}_R$  gleichen Betrages auffassen (Abbildung 2.3).

Für eine optisch aktive Probe unterscheiden sich die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_L$  und  $\epsilon_R$  für links und rechts zirkular polarisiertes Licht. Der Unterschied  $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$  kann positiv oder negativ sein, d.h. der links oder rechts zirkular polarisierte Strahl kann stärker absorbiert werden. Der Unterschied  $\Delta\epsilon$  ist die eigentliche Messgröße der CD-Spektroskopie.

Beim Bestrahlen optisch aktiver Proben ( $\Delta\epsilon \neq 0$ ) entsteht aus linear polarisiertem Licht elliptisch polarisiertes Licht, dessen Hauptschwingungsachse gegenüber dem einfallenden Licht um den Winkel  $\alpha$  gedreht ist.



**Abbildung 2.3**

Linear polarisiertes Licht setzt sich aus rechts und links zirkular polarisiertem Licht zusammen (links). Nach Durchgang durch eine optisch aktive Probe ( $\epsilon_L \gg \epsilon_R$ ) ist das Licht bei Austritt elliptisch polarisiert. Das Verhältnis der beiden Ellipsenachsen definiert man als Tangens des Winkels  $\Theta$  (ganz rechts).

Das Verhältnis der kurzen zur langen Ellipsenachse (Abbildung 2.3) definiert man als Tangens des Winkels  $\Theta$ , der sog. Elliptizität  $\Theta_\lambda$ :

$$\tan \Theta \equiv \frac{b}{a} = \frac{|E_R| - |E_L|}{|E_R| + |E_L|} \quad (2.35)$$

Die Elliptizität ist wellenlängenabhängig.  $I_{R,L}$  ist die Intensität des rechts bzw. links zirkular polarisierten Lichts nach dem Absorptionvorgang. Die Lichtintensitäten sind nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit dem Extinktionskoeffizienten verknüpft. Setzt man sie in die Definitionsgleichung für die Elliptizität ein, so erhält man näherungsweise für kleine  $\Theta$ :

$$\Theta_\lambda = \ln 10 \times \frac{180^\circ}{4\pi} \times (\epsilon_L - \epsilon_R) \times c_m \times d \quad (2.36)$$

Die Molare Elliptizität ist schließlich definiert als:

$$[\Theta_M]_\lambda = \frac{[\Theta]_\lambda \times M}{100} \approx 3000 \times \Delta\varepsilon \quad (2.37)$$

In einem CD-Spektrum ist  $\Delta\varepsilon$  oder die Elliptizität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Man kann sowohl positive, als auch negative Werte erhalten. Typische Werte der Elliptizität liegen im Milligrad Bereich. Das heißt, dass die Effekte des Zirkular Dichroismus sehr klein sind:

$$\frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon} \approx 10^{-4} \quad (2.38)$$

Bei der experimentellen Bestimmung der Elliptizität muss die Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht gemessen werden. Dazu wird auch hier zunächst linear polarisiertes Licht erzeugt. Dieses wird durch einen photoelastischen Modulator (PEM) zwischen links und rechts zirkular polarisiert mit einer Frequenz von etwa 20-100 kHz moduliert. Das Prinzip des PEM beruht auf der linearen Spannungsdoppelbrechung (Winter & Noll 1998).

### 2.1.10 Ursache der optischen Aktivität

Elektronische Übergänge optisch aktiver Moleküle sind mit einer helikalen Ladungsverschiebung verbunden. Zusätzlich zum elektrischen Übergangsdipolmoment tritt ein magnetisches Dipolmoment auf. Ein Molekül besitzt nur dann optische Aktivität, wenn elektrisches und magnetisches Übergangsdipolmoment eine parallele Komponente zueinander besitzen und nicht senkrecht aufeinander stehen. Man erhält die so genannte Rotationsstärke  $R_{21}$  für den Übergang (1→2) als Maß für die Stärke der optischen Aktivität über den Imaginärteil des Skalarproduktes der beiden Übergangsdipolmomente:

$$R_{21} = \text{Im}(\vec{\mu}_{21}^{el} \cdot \vec{\mu}_{21}^{magn}) \quad (2.39)$$

Für die CD-Spektroskopie ist es von Bedeutung, welche Chromophore optische Aktivität zeigen. Zunächst kann dies einmal jedes absorbierende Molekül sein, das keine Symmetrieebene oder Symmetriezentrum aufweist. Dazu gehören bis auf Glycin alle in der Natur vorkommenden Aminosäuren, da ihre  $\alpha$ -Kohlenstoffatome jeweils vier verschiedene Substituenten tragen. Optische Aktivität kann jedoch auch hervorgerufen werden, wenn ein planarer Chromophor sich in einer asymmetrischen Mikroumgebung befindet. Dies führt zu einer induzierten optischen Aktivität. Des Weiteren besitzen viele Biopolymere helikale Sekundärstrukturen. Die Carbonylgruppen der Peptidbindungen zeigen damit optische Aktivität nicht nur aufgrund ihrer Bindung an die asymmetrischen  $\alpha$ -Kohlenstoffatome, sondern auch durch die Kopplung der Anregung mit benachbarten Peptidbindungen. Diese Kopplungen sind ebenfalls in DNA und RNA wichtig. Die Kopplung von Chromophoren führt dazu, dass die optischen Aktivität ein empfindlicher Monitor der Sekundärstruktur von Biomolekülen ist und entsprechend gerne zur Strukturanalyse genutzt wird.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probenpräparation

Die verschiedenen Proben des Phytochroms Agp1 von *Agrobacterium tumefaciens* wurden in der AG von Dr. Lamparter des Instituts für Pflanzenphysiologie der Freien Universität Berlin wie in (Borucki 2005, von Stetten 2006, Noack 2007) beschrieben angefertigt und mir in tiefgefrorenem Zustand (-80°C) zur Verfügung gestellt.

Für die Messungen wurden die Proben aufgetaut und denaturiertes Protein durch Zentrifugation (30 Minuten, 10°C, 13000 rpm Eppendorf Tischzentrifuge 5415R, Hamburg) entfernt.

Die spektroskopischen Messungen wurden üblicherweise in 20 mM Tris/HCl und 50 mM NaCl Lösungen bei pH-7,8 angefertigt. Dazu wurden die aufgetauten Proben auf eine mit 20 mM Tris/HCl und 50 mM NaCl (pH-7,8) equilibrierte NAP-10-Säule (Amersham, Upsala Schweden) aufgetragen und mit 20 mM Tris/HCl und 50 mM NaCl eluiert.

Für die Bestimmung der transienten Protonierungsänderungen mit pH-Indikatoren und für die Bestimmung des pKs des Chromophors wurden die Proben mit einer 50 mM NaCl eluiert und der pH anschließend auf den gewünschten Wert durch Zugabe von HCl bzw. KOH eingestellt.

Die Konzentration wurde üblicherweise so gewählt, dass die Absorption bei 702 nm bei einer Schichtdicke von fünf mm etwa 1OD betrug.

Wenn die Konzentration der Proben nicht ausreichte, wurde die Konzentration durch verwenden von Microcon YM-30 „Centrifugal Filter Devices“ mit einem Ausschlussgewicht von 30 kDa erhöht. Dazu wurde die Probe auf den Filter aufgetragen und anschließend mit 3000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge 5415R zentrifugiert. Das konzentrierte Filtrat wurde aufgenommen und für die Messungen verwendet.

Die Ppr-Proben des Purpurbakteriums *Rhodospirillum centenum* wurden wie in (Kyndt 2007) beschrieben in der AG von Cusanovich in Tucson Arizona präpariert und in 50 Prozent Glycerol bei -10°C verschickt.

Für die Messungen wurden die Proteinlösung unter Lichtausschluss mit dem mitgelieferten Verdünnungspuffer 2:5 verdünnt, so dass die Proben in 20 Prozent Glycerin, 400 mM NaCl, 150 mM Imidazol und 50 mM Kaliumphosphat Puffer vorlagen. Der pH-Wert der Lösung betrug 7,0.

Für die Messungen mit dem pH-Indikator wurden der Probe wie oben beschrieben der Puffer und das Glycerin durch eine NAP-Säule entfernt, indem die Ppr-Lösung mit einer 50 mM NaCl Lösung eluiert wurde.

### 2.2.2 Spektrophotometrische Messungen

Die Messungen wurden mit den Zweistrahlphotometern UV-20102PC und UV-260 von Shimadzu (Japan) angefertigt. Die Standardmessungen wurden mit einer Spaltbreite von zwei nm bei halber Spalthöhe, mit einem Aufnahmeintervall von einem nm bei mittlerer Geschwindigkeit über den Wellenlängenbereich von 850-250 nm bei Raumtemperatur angefertigt. Der zeitliche Verlauf des Photomultipliers wird vom Messprogramm analysiert und mit einer zuvor aufgenommenen Basislinie (ohne Probe und Referenz) verrechnet. Als Referenz wurde in der Regel eine mit Wasser gefüllte Küvette verwendet, die mit der Küvette der Probe identisch ist.

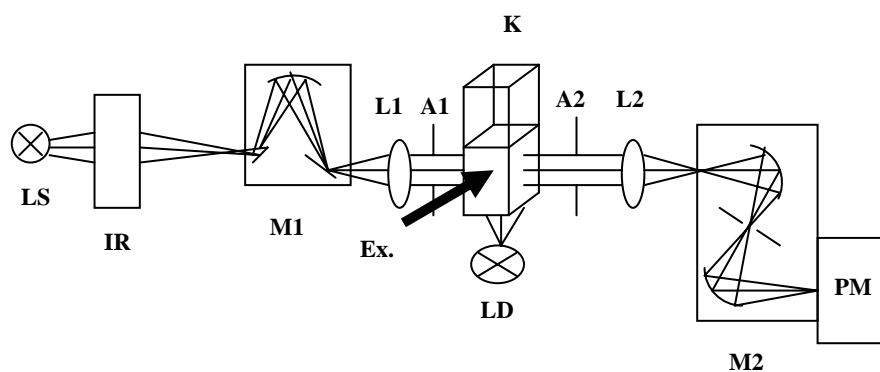
Für die Aufnahme der Spektren der beiden Grundzustände wurde für die  $P_r$  Form entweder das Dunkelspektrum aufgenommen oder die Probe vor der Messung für 20 s mit einer Laserdiode (RLD-78PZW2,  $\lambda_{em} \approx 785$  nm) für 20 s beleuchtet. Das  $P_{fr}$ -Spektrum wurde nach einer Minute Beleuchtung mit einer LED ( $\lambda_{em} \approx 680$  nm, Quantum Device) aufgenommen.

### 2.2.3 Zeitaufgelöste Messungen

#### 2.2.3.1 Aufbau

Die Blitzlichtapparatur für die Untersuchung der Kinetik der Phytochrome Agp1 und Ppr wurde im wesentlichen von C. Zscherp übernommen und wurde nur in einigen Details modifiziert (Zscherp 1993). Das Messprogramm für die Datenaufnahme basierte auf dem Messprogramm von S. Dickkopf (Dickkopf 1998a) und wurde innerhalb der AG aktualisiert und verbessert.

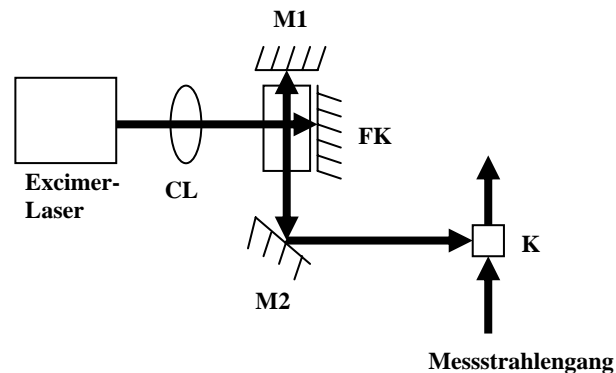
Der Strahlengang des Messlichtes ist in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt. Als Lichtquelle (LS) des Messlichtes diente eine 100-W-Halogenlampe (Spindler & Hoyer). Vor dem Eingang in den Monochromator 1 (M1) wurde ein Infrarotfilter in Form einer mit Wasser gefüllten Quarzglasküvette platziert, um den Monochromator vor Wärmestrahlung zu schützen. Das divergente Licht vom Austrittsspalt (Spaltbreite ein mm) von M1 wird mit einer Linse (L1) gesammelt, so dass die Probe, eine fünf mm-Küvette, von einem parallelen Lichtbündel durchleuchtet wird. Die beiden Blenden A1 und A2 schneiden inhomogene Randstrahlen ab. Die Linse L2 fokussiert den Strahl wiederum auf den Eintrittsspalt des Doppelmonochromators M2 (DH10VIS, Dispersion vier nm/mm, Jobin-Yvon, I.S.A.). Für alle drei Spalten wurde eine Spaltbreite von zwei mm gewählt, womit die spektrale Bandbreite sechs nm beträgt. Mit dem Photomultiplier (PM) (R928, Hamamatsu) wird die Intensität des transmittierten Lichts detektiert, wobei die Ausgangsspannung der Lichtintensität proportional ist. Für die Messungen der Photokonversion von  $P_r \rightarrow P_{fr}$  mussten die Proben vor jeder Anregung in den Ausgangszustand ( $P_r$ ) zurück konvertiert werden. Dazu wurde unter der Küvette ein Laserdiode (LD) (RLD-78PZW2,  $\lambda_{em} \approx 785$  nm, Laser Components) platziert und so in das Messprogramm eingebunden, dass die Probe vor jeder Anregung für 20 Sekunden mit der LD vorbeleuchtet wurde.



**Abbildung 2.4: Meßlichtstrahlengang der Blitzlichtapparatur.**

- LS: Lichtquelle (100 W Halogen)
- IR: Infrarotfilter
- M1, M2: Monochromatoren
- L1, L2: Sammellinsen
- A1, A2: Blenden
- K: Küvette 5mm
- PM: Photomultiplier
- LD: Laserdiode. Der mit Ex bezeichnete Pfeil gibt die Anregungsrichtung an.

Zur Anregung des  $P_r$ -Zustandes von Agp1 und Ppr wird ein kurzer Laserpuls mit dem Absorptionsmaximum nahe 700nm benötigt. Diese Laserpuls wurde durch einen Excimer Laser gepumpter Farbstofflaser erzeugt. Der Excimer-Laser (Radiant Dyes, RD-EXC-100) wird mit XeCl betrieben und liefert UV-Blitze von 308 nm mit einer Energie von 60-90 mJ, welche jedoch stark abhängig ist vom Zustand des Gasgemisches. Der Farbstofflaser besteht aus einer Farbstoffküvette und einem Endspiegel. Für eine höhere Energieausbeute wird der gestreute Strahl über den Spiegel (M1) in den Gesamtstrahl integriert (Abbildung 2.5). Die Laseranregung erfolgte senkrecht zum Messstrahlengang (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Laseranregung in der Draufsicht**

CL: Kondaktor Linse  
 FK: Farbstoffküvette mit Endspiegel  
 M1, M2: Spiegel  
 K: Küvette.

Als Laserfarbstoffe wurden Pyridin 1 und 4-(dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran kurz DCM benutzt, die in Propylencarbonat aufgelöst Emissionsmaxima von 695 nm und 640 nm aufweisen. Die Energie des emittierten Lichts des Farbstoffes Pyridin 1 lag bei 3-5 mJ und die von DCM bei fünf bis zehn mJ.

### 2.2.3.2 Steuerung und Datenaufnahme

Im Folgenden wird kurz das Messprinzip erläutert, bevor dann der Messablauf und die Steuerung beschrieben werden. Das Spannungssignal des Photomultipliers  $V(t)$  ist proportional zur transmittierten Intensität  $I(t)$ . Da Absorptionsänderungen untersucht werden sollen, die meistens klein gegenüber dem Absolutwert sind, ist es zweckmäßig, nicht  $V(t)$  als absolute Größe zu messen, sondern die Änderung bezüglich des Referenzwertes  $V_0$ . Dazu wird dem Signal eine Gegenspannung  $V_G$  überlagert, so dass die Referenzspannung  $V_0$  in etwa kompensiert wird ( $V_G \approx V_0$ ). Als Messgröße ergibt sich also:

$$V^M(t) = V(t) + V_G \quad \text{und} \quad V_0^M = V_0 + V_G \quad (2.40)$$

Damit wird die Absorptionsänderung in der folgenden Form berechnet:

$$\Delta A(t) = -\log \left[ 1 + \frac{V^M(t) - V_0^M}{V_0} \right] \quad (2.41)$$

Im Messablauf müssen also neben der zeitlichen Änderung  $V^M(t)$  auch die Werte  $V_0^M$  und  $V_0$  gemessen werden. Zur Messung von  $V_0$  wird die Gegenspannung über ein Relais für ein definiertes Zeitintervall ausgeschaltet.  $V_0^M$  wird über den Pretrigger der Datenaufnahme erfasst.

Der gesamte Messablauf wird durch einen 486er-PC mit einer I/O-Einsteckkarte (Kolter Elektronik) gesteuert. Mit der I/O-Karte werden die Peripheriegeräte jedoch nicht direkt angesprochen, sondern über ein Interface, das die Signalübermittlung durch Optokoppler realisiert. Das Signal des Photomultipliers wird zunächst mit einem Messverstärker (AD9610, Analog Devices) um den Faktor 40 verstärkt und in zwei Kanäle aufgeteilt. Durch Tiefpassfilter entsprechender Bandbreite können die Signale geglättet werden. Die Datenaufnahme der beiden Kanäle erfolgt dann mit Analog-Digital-Wandlern, die das Signal mit unterschiedlichen Zeitbasen abtasten. Der schnelle Kanal wird mit einem Speicheroszilloskop (9350A, LeCroy) aufgezeichnet, das bei 500 MHz Analogbandbreite eine Abtastrate von einem GHz zulässt, 8-bit Amplitudenauflösung hat und mit einer Speichertiefe von 100 kbyte ausgerüstet ist. Der Speicher wird über die IEEE-Schnittstellenkarte (488-PC2, Meilhaus) ausgelesen. Zur Datenaufnahme im langsamen Kanal wird eine Einsteckkarte (T512, ImTEC) mit 12-bit Amplitudenauflösung und zwei Mbyte Speichertiefe verwendet. Bei den meisten Messungen wurde die Abtastrate so gewählt, dass im Zeitbereich von 100 ns bis fünf Sekunden aufgezeichnet wurde, wobei beide Kanäle dann noch ausreichend überlappen um den Abgleich durchzuführen. Im Messprogramm implementiert ist eine logarithmische Datenreduktion, so dass die Datenpunkte auf einem logarithmisch äquidistanten Zeitraster mit 100 Punkten pro Dekade liegen. Durch diese Art der Mittelung nimmt die Streuung der reduzierten Daten kontinuierlich mit der Zeit ab. Langsame Prozesse werden so mit höherer Genauigkeit erfasst als schnelle. Ebenfalls in das Messprogramm integriert ist die Berechnung der Absorptionsänderung  $\Delta A(t)$  aus den Spannungswerten  $V_0^M$  und  $V_0$ , und dem zeitliche Verlauf  $V^M(t)$  nach Gl. 2.38. Eine weitere Mittelung erfolgt durch die Integration über mehrere Einzelblitze. Ebenfalls in das Messprogramm integriert ist das Signal für die Vorbeleuchtung der Probe, wie oben schon erwähnt.

### 2.2.3.3 Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen

Für die Aufnahme der transienten Absorptionsänderungen wurde der unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschriebene Aufbau verwendet. Als Anregungslicht wurden die zehn ns lange Laserblitze des Farbstofflasers verwendet, der durch den Excimerlaser ( $\lambda_{em} \approx 308$  nm) angeregt wurde. Die Anregungswellenlänge waren  $\approx 695$  nm für den Farbstoff Pyridin 1 und  $\approx 640$  nm für den Farbstoff DCM. Bei Standardmessungen wurden Zeitspuren bei mindestens 35 verschiedenen Wellenlängen über einen Zeitbereich von 100 ns bis zu fünf Sekunden aufgenommen. Jede dieser Zeitspuren setzt sich aus zehn Einzelmessungen zusammen, die auf einer logarithmischen Zeitskala gemittelt wurden. Vor jeder Anregung wurden die Phytochromproben durch beleuchten mit einer 784 nm Laserdiode (siehe 2.2.3.1) (60 mW, 20 s) zu mehr als 95 Prozent in den  $P_r$ -Zustand zurück konvertiert.

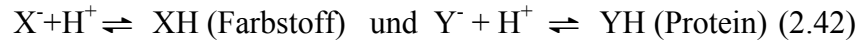
Die Phytochrom-Domäne von Ppr- und die Agp1-Mutanten D197A und H250A ließen sich nicht durch dunkelrotes Licht in den  $P_r$ -Zustand zurückkonvertieren. In diesem Fall wurde zwischen einzelnen Blitzen die Probe für eine definierte Zeitspanne unter Lichtausschluss stehen gelassen, bis sich durch Dunkelreversion der Probe in etwa der Ausgangszustand ausgebildet hatte.

### 2.2.4 Die Protonen-Stöchiometrie

Die Stöchiometrie der Protonen Abgabe und Aufnahme wird üblicherweise dadurch bestimmt, dass das Farbstoffsignal durch Mikrotitrations kalibriert und die Konzentration der am Zyklus beteiligten Moleküle normalisiert wird (Otto 1990). Bei der Kalibrierung, bei der konzentrierte Säuren und Basen eingesetzt werden, kann es durch Denaturierung des Proteins

zu erheblichen Fehlern kommen. Deshalb kamen in dieser Arbeit zwei Methoden zum Einsatz, bei denen diese Kalibrierung nicht benötigt wurde.

Die erste Methode, die Sättigungsmethode, basiert darauf, dass der Farbstoff und das Protein als kompetitiver Puffer agieren (Borucki 2002, Borucki 2006):



Die Abhängigkeit der Konzentration der Spezies  $X^-$  und  $Y^-$  ist durch die Henderson-Hasselbalch Gleichung gegeben. Für kleine pH-Änderungen kann die Gleichung durch Linearisierung vereinfacht werden.

$$\begin{aligned} \Delta[X^-](f) &= f C_x \Delta pH(f) \\ \Delta[Y^-](f) &= C_y \Delta pH(f) \end{aligned} \quad (2.43)$$

$C_x$  und  $C_y$  sind Konstanten und der Faktor  $f$  drückt aus, dass die Konzentrationsänderung der deprotonierten Farbstoffspezies proportional der Farbstoffkonzentration für die pH-Änderung ist. Die pH-Änderung wiederum hängt von der Änderung der Protonen, der Änderung der deprotonierten Farbstoffspezies und der Konzentrationsänderung von  $Y^-$  ab:

$$\Delta[H^+] = -\Delta[X^-](f) - \Delta[Y^-](f) - C_z \Delta pH(f) \quad (2.44)$$

Aus diesen drei Gleichungen können  $\Delta pH(f)$  und  $\Delta[Y^-](f)$  eliminiert werden und man erhält:

$$\Delta[H^+] = -\left(1 + \frac{C_y + C_z}{C_x f}\right) \Delta[X^-](f) \quad (2.45)$$

Durch umformen und Substitution von  $(C_y + C_z)/C_x$  durch  $C_A$  erhält man

$$\Delta[X^-](f) = -\Delta[H^+] \frac{1}{1 + C_A / f} \quad (2.46)$$

Die Konzentrationsänderung von  $X^-$  als Funktion von  $f$  hängt also nur von den beiden unabhängigen Parametern  $\Delta[H^+]$  und  $C_A$  ab. Mit der Einführung von  $\Delta[X^-](1) = -\Delta[H^+]/(1 + C_A)$  und  $p = 1 + C_A$  und der Substitution von  $\Delta[H^+]$  und  $C_A$  erhält man:

$$\Delta[X^-](f) = \Delta[X^-](1) \frac{f}{1 + (f - 1)/p} \quad (2.47)$$

Multipliziert man auf beiden Seiten den Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{\text{Farbst.}}$  des deprotonierten Farbstoffes und die Schichtdicke  $d$ , erhält man eine Sättigungskurve des Farbstoffsignals als Funktion der Farbstoffkonzentration:

$$\Delta A(f) = \Delta A(1) \frac{f}{1 + (f - 1)/p} \quad (2.48)$$

(mit  $f$  der relative Farbstoffkonzentration,  $\Delta A(1)$  dem Farbstoffsignal bei  $f = 1$ , und dem Parameter  $p$  des Verhältnisses von  $\Delta A(f \rightarrow \infty)/\Delta A(1)$ ).

Um die beiden Parameter  $\Delta A(1)$  und  $p$  zu bestimmen, wird das Farbstoffsignal bei den Farbstoffkonzentrationen 40, 80, 120 und 160  $\mu\text{M}$  gemessen. Zu ausgewählten Zeitpunkten wird die Absorptionsänderung über die relative Farbstoffkonzentration ( $f = 1 = 40 \mu\text{M}$ ) aufgetragen und die Kurve mit Gleichung (2.48) gefittet. Das Produkt aus  $\Delta A(1)$  und  $p$  ( $\Delta A(\lambda_{\text{Dye}}, f \rightarrow \infty)$ ) gibt den Wert des Farbstoffsignals an, bei dem der Umsatz der Farbstoffmoleküle äquivalent zur Protonenabgabe oder -aufnahme ist ( $\Delta[H^+]$ ).

Für die Berechnung der Protonenstöchiometrie ( $n$ ) muss der erhaltene Wert noch auf den Anteil der angeregten Phytochrommoleküle normiert werden. Dieser Anteil kann aus dem Absorptionssignal des Proteins zum entsprechenden Zeitpunkt und dem Extinktionskoeffizienten des Proteins bei der entsprechenden Wellenlänge bestimmt werden.

$$n = \frac{\Delta A(\lambda_{Dye}, f \rightarrow \infty) / \varepsilon_{Dye}(\lambda_{dye})}{\Delta A_{meas}(\lambda, t) / \varepsilon_{phy}(\lambda)} \quad (2.49)$$

Eventuell muss das Referenzsignal ( $\Delta A_{meas}(\lambda, t)$ ) noch mit Anteilen des Farbstoffes bei der entsprechenden Wellenlänge korrigiert werden:

$$\Delta A_{corr}(\lambda, t) = \Delta A_{meas}(\lambda, t) + \Delta A_{Dye}(\lambda_{Dye}, t) \quad (2.50)$$

Die zweite Methode wurde zuerst von Grzesiek & Dencher (Grzesiek 1986) beschrieben und von Borucki (Borucki 2006) vereinfacht. Dabei wird die Stöchiometrie durch Analyse der Abhängigkeit des Farbstoffsignals von der Konzentration von einem zugegebenen Puffer bei konstanter Farbstoff und Proteinkonzentration bestimmt. Der Ansatz ist analog zur ersten Methode, es wird nur ein zusätzlicher Parameter benötigt, der sich durch Titration des Farbstoffes bei verschiedenen Pufferkonzentrationen in Abwesenheit des Proteins bestimmen lässt. Die Henderson-Hasselbalch Gleichungen können für die deprotonierte Spezies des Farbstoffes ( $X^-$ ), des Proteins ( $Y$ ) und des Puffers ( $W$ ) wie oben linearisiert werden:

$$\begin{aligned} \Delta[X^-](f) &= fC_x \Delta pH(f) \quad (a) \\ \Delta[Y^-](f) &= C_y \Delta pH(f) \quad (b) \\ \Delta[W^-](f) &= fC_w \Delta pH(f) \quad (c) \end{aligned} \quad (2.51)$$

Die Protonenbilanz ergibt sich analog zu Gl. 2.44 :

$$\Delta[H^+] = -\Delta[X^-](f) - \Delta[Y^-](f) - \Delta[W^-](f) - C_z \Delta pH(f) \quad (2.52)$$

wobei  $C_z$  den Anteil der Pufferwirkung von Wasser beschreibt. Analog zur ersten Methode wird durch Eliminierung und Umformung

$$\Delta[X^-](f) = \frac{\Delta[H^+] \frac{C_x}{C_w}}{\frac{C_x + C_y + C_z}{C_w} + f} \quad (2.53)$$

erhalten. Durch Multiplikation von Gl. 2.53 mit  $(d\varepsilon_{Dye})$  erhält man das Farbstoffsignal  $\Delta A_{Dye}$  als Funktion der relativen Pufferkonzentration und den zwei unabhängigen Parametern A und B:

$$\Delta A_{Dye}(f) = \Delta[X^-](f) d\varepsilon_{Dye} = -\frac{A}{B + f} \quad (2.54)$$

mit

$$A = -\Delta[H^+] \frac{C_x}{C_w} d\varepsilon_{Dye} \quad \text{und} \quad B = (C_x + C_y + C_z) / C_w \quad (2.55)$$

A und B erhält man durch einen Fit der gemessenen Farbstoffsignale mit Gl. 2.54. Um  $\Delta[H^+]$  aus dem Parameter A zu erhalten muss  $C_x/C_w$  durch eine Kalibrierung ohne Protein bestimmt werden. Dazu wird  $C_y$  in Gl. 2.53 gleich null gesetzt und die intrinsische Protonensenke oder -quelle ( $\Delta[H^+]$ ) wird durch die externe Zugabe von Säure und Base ( $\Delta[H^+]_{ext}$ )



ersetzt. Dann wird die Absorptionsänderung  $\Delta A_{\text{Dye}}$  durch Zugabe von Säure und Base bei verschiedenen Pufferkonzentrationen gemessen. Das Verhältnis der Konzentrationsänderung der externen Protonenzugabe zur Absorptionsänderung des Farbstoffes ist linear zur relativen Pufferkonzentration  $f$  und ist gegeben durch:

$$\frac{-\Delta[H^+]_{\text{ext}}}{\Delta A_{\text{Dye}}(f)} = \frac{1}{d\varepsilon_{\text{Dye}}} \left( \frac{C_x + C_z}{C_x} + \frac{C_w}{C_x} f \right) \quad (2.56)$$

Aus der Steigung von Gl. 2.54 ( $d\varepsilon_{\text{Dye}} C_x / C_w$ )<sup>-1</sup> und dem Parameter A aus Gl. 2.55 kann  $\Delta[H^+]$  bestimmt werden.

Die zweite Methode ist vor allem bei den pH Elektroden Messungen zum Einsatz gekommen, bei denen die stationären pH-Änderungen verfolgt wurden. In dem Fall agiert die Elektrode anstelle des Farbstoffes als konkurrierender Puffer. In diesem Fall bezieht sich Gl. 2.51 a auf die pH-Elektrode und es muss nur eine kleine Änderung an Gl 2.53 vorgenommen werden, um das gemessene pH-Signal als Funktion der relativen Pufferkonzentration zu beschreiben. Die Eliminierung von  $\Delta[X^-](f)$  statt  $\Delta pH(f)$  von Gl 2.51 (a-c) und 2.52 führt dann zu:

$$\Delta pH(f) = - \frac{\Delta[H^+] \frac{1}{C_w}}{\frac{C_x + C_Y + C_z}{C_w} + f} \quad (2.57)$$

Die Kalibrierung durch Mikrotitrationen bei verschiedenen Pufferkonzentrationen in der Abwesenheit des Proteins ist praktischerweise dieselbe wie mit dem Farbstoff:

$$\frac{-\Delta[H^+]_{\text{ext}}}{\Delta pH(f)} = C_x + C_z + C_w f \quad (2.58)$$

### 2.2.5 Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Der Einfluss der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit kann nur über die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  erfolgen. Eine Temperaturerhöhung kann sich sehr unterschiedlich auf die Geschwindigkeitskonstante auswirken. In umfangreichen Studien fand Arrhenius, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k_n$  einer e-Funktion proportional ist, die im negativen Exponenten den Kehrwert der absoluten Temperatur enthält (Wedler 1987):

$$k_n = k_0 e^{-A/T} \quad (2.59)$$

Durch Erweitern des Exponenten mit der Boltzmann-Konstante  $k$  wird aus der Arrhenius-Gleichung 2.59:

$$k_n = k_0 e^{\frac{A \times k}{kT}} = k_0 \times e^{\frac{\varepsilon_a}{kT}} = k_0 \times e^{\frac{N_A \varepsilon_a}{RT}} \quad (2.60)$$

Der Ausdruck  $\exp(-\varepsilon_a/kT)$  gibt den Bruchteil der Moleküle an, die eine Energie größer als oder gleich  $\varepsilon_a$  besitzen.  $\varepsilon_a$  wird auch als Aktivierungsenergie bezeichnet, und da man meistens nicht die Aktivierungsenergie eines Moleküls betrachtet wird der Exponent mit der Loschmidtschen Konstante  $N_A$  erweitert.

Bei den thermischen Relaxationsprozessen der Kinetik von Phytochrom nach Lichtanregung kann man nach den oben getroffenen Annahmen in erster Näherung von einer Kinetik erster Ordnung ausgehen. Um die Aktivierungsenergie der einzelnen Schritte zu ermitteln müssen

die Raten der Übergänge ( $\ln k_n$ ) gegen  $1/T$  aufgetragen werden. Diese Auftragung sollte nach Gl. 2.60 eine Gerade mit der Steigung  $E_a/R$  ergeben:

$$\ln k_n = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (2.61)$$

$E_a$  erhält man dann durch Multiplikation mit  $R$ .

### 2.2.6 CD-Messungen

Die CD-Spektren wurden mit dem modifizierten CD-Spektrometer Jasco 500-A angefertigt. Die Datenaufnahme des Gerätes wurde innerhalb der Arbeitsgruppe verbessert und ein schnellerer A/D-Wandler integriert. Die Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur bei einer Schichtdicke von zehn mm aufgenommen. Insgesamt wurden pro Zustand mindestens 20 Durchläufe über den Wellenlängenbereich von 300-800 nm gemessen und gemittelt. Für die Korrektur der Basislinie wurden Spektren mit einer baugleichen Küvette, die mit Puffer gefüllt war aufgenommen und vom gemessenen CD-Signal abgezogen.

In der Regel wurde mit einer Zeitkonstante von  $64 \times 10^{-3}$  s und einer Sensitivität von  $2 \text{ m}^\circ/\text{cm}$  gemessen.

### 2.2.7 pH-Elektroden Messungen

Die pH-Messungen wurden mit einer konventionellen pH-Elektrode (LL Biotrode, Metrom, Switzerland) und einem pH-Meter (Digital-pH-Meter Typ 647, Knick, Germany) durchgeführt. Vor jeder pH-Messung wurde die Elektrode mittels Pufferlösungen für den entsprechenden pH-Bereich kalibriert.

Die pH-Messungen der Lichtinduzierten Protonenänderungen wurden in einer fünf mal fünf mm Küvette (Suprasil QS) mit einer ungepufferten Phytochromprobe mit der oben genannten pH-Elektrode und dem oben genannten pH-Meter durchgeführt. Für die digitale Aufnahme der pH-Änderungen wurde das pH-Meter mit dem Digital-Multimeter DMM M 4650 CR (Conrad Electronic) verbunden, dass wiederum an die COM-Buchse des PC (mittels MT/RS 232-Kabel) angeschlossen war. Ausgelesen wurden die Daten mittels der mitgelieferten Software (m\_4650cr/digiscop). Das Signal des pH-Meters wurde mit einer Rate von drei  $\text{s}^{-1}$  aufgenommen. Die Probe wurde dann abwechselnd mit sättigendem roten (LED,  $\lambda_{\text{em}} \approx 680 \text{ nm}$ ) und dunkelrotem (Laserdiode RLD-78PZW2,  $\lambda_{\text{em}} \approx 784 \text{ nm}$ ) belichtet. Die Stöchiometrie wurde nach der in 2.2.4 beschriebenen zweiten Methode bestimmt.

### 2.2.8 Stopped-Flow Messungen

In der im Labor zusammengebauten Apparatur wird die transmittierte Intensität simultan bei 512 Wellenlängen gemessen. Der Aufbau besteht aus einer weißen Xe-Lichtquelle (XBO 75, Müller Elektronik-Optik, Moosinning, Deutschland), einer Mischkammer (SHU-61, Hi-Tech, Salisbury, U.K.), einem 125 mm-Spektrometer (77400-M, Oriel, Stratford, CT) und einer linearen CCD-Zeilenkamera (CCD2010, Entwicklungsbüro G. Stresing, Berlin). Lichtquelle und Mischkammer sowie Mischkammer und Spektrometer sind durch Lichtleiter verbunden. Das Licht wird also erst nach der Probe dispergiert. Es werden bis zu 20.000 Zeitpunkte pro Schuss aufgenommen. Die Absorptionsänderungen werden in der Regel über zehn bis 20 Schüsse gemittelt. Spektrale und zeitliche Mittelung führen zu einer erheblichen Datenreduktion mit typischerweise 60 Wellenlängen und 60 logarithmisch äquidistanten Zeitpunkten. Die

Mischeinheit erfordert nur sehr kleine Probenvolumina und die Mischzeit beträgt weniger als zwei ms. Aus der transmittierten Intensität wird die Absorptionsänderung  $\Delta A(\lambda, t)$  bezüglich des Endspektrums berechnet. Das  $\Delta A(\lambda, t)$ -Datenfeld wird mittels Singulärwertzerlegung (SVD) analysiert, was zu einer Glättung führt und die Anzahl der relevanten spektralen Komponenten liefert (Borucki 2003).

In diesem Fall sollte die Relaxationskinetik des Protonengleichgewichtes des Dunkelzustandes der D197A Mutante nach einem pH Sprung von 6,5 auf 7,9 verfolgt werden. Dazu wurde die D197A-Probe in fünf mM Trispuffer mit einem pH von 6,5 mit einer 100 mM Trispuffer Lösung bei pH-8,0 in der Stopp-Flow Apparatur gemischt und die Kinetik der Relaxation von zwei ms bis 500 ms aufgenommen.

### 2.2.9 Stationäre Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit dem Fluoreszenz-Spektrometer Fluoromax 3 von Horiba Jobin Yvon (New York, USA) angefertigt. Alle Messungen erfolgten in 20 mM Tris und 50 mM NaCl Lösungen. Der pH-Wert wurde durch Mischen mit voreingestellten Tris/NaCl Lösungen eingestellt. Die Messungen erfolgten weiterhin bei 20°C und wurden aufgrund des „Inner-Filter Effekts“ auf eine OD von 0,05 verdünnt. Die Spaltbreiten waren 2 nm in der Anregung und zehn nm in der Emission. Die Messungen erfolgten mit einer Halbmikroküvette aus Quarzglas (Suprasil QS 1.000; Hellma, Müllheim) und zwar so dass die Pfadlänge in der Anregung vier mm und in der Emission zehn mm betrug. Die Integrationszeit wurde auf 0.1 s und das Inkrement auf 0,5 nm eingestellt.

Die erhaltenen Fluoreszenzspektren waren reine Rohdaten, dass heißt es fand keine Korrektur statt.

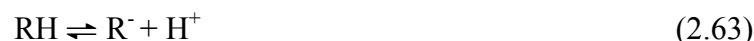
### 2.2.10 Bestimmung des pK-Wertes des protonierten Chromophors

Die Bestimmung des pK-Wertes des protonierten Chromophors erfolgte in einer ungepufferten Lösung mit 50 mM NaCl unter Lichtausschluss. Der pH-Wert wurde auf etwa sechs oder 6,5, je nach Stabilität der Probe eingestellt und dann sukzessive durch Titration mit verschiedenen konzentrierter KOH-Lsg. erhöht. Nach Bestimmung des pH-Wertes wurden Absorptionsspektren der Probe aufgenommen. Von dem erhaltenen Datenfeld wurde dann die Absorption der Q-Bande bei 702 nm als Funktion des pH-Wertes aufgetragen und mit der angepassten Henderson-Hasselbalch Gleichung gefittet:

$$A(pH) = A_{RH} + (A_{R^-} - A_{RH}) \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (2.62)$$

wobei  $A(pH)$  die Absorption als Funktion des pH,  $A_{RH}$  die Absorption des protonierten Chromophors und  $A_{R^-}$  die Absorption des deprotonierten Chromophors ist.

Die Formel und Form des Graphen ist typisch für die Beschreibung eines Gleichgewichtes zwischen zwei Zuständen, in dem Fall dem protonierten und deprotonierten Chromophor:



Die Herleitung von Gleichung (2.62) erfolgt aus der zugehörigen Henderson-Hasselbalch Gleichung

$$pH = pK_a + \lg \frac{[R^-]}{[RH]} \quad (2.64)$$

aus der sich mit

$$[R]_{ges} = [RH] + [R^-] \quad (2.65)$$

nach Auflösen

$$[R^-] = \frac{[R]_{ges}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (2.66)$$

ergibt.

Die Gesamtabsorption setzt sich aus den Beiträgen des Agp1 mit protoniertem (A(RH)) und deprotoniertem (A(R<sup>-</sup>)) Chromophor zusammen.

$$A(pH) = A(RH) + A(R^-) \quad (2.67)$$

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnen man diese

$$A(RH) = \varepsilon_{RH} \cdot [RH] \cdot d \quad (2.68)$$

$$A(R^-) = \varepsilon_{R^-} \cdot [R^-] \cdot d \quad (2.69)$$

$\varepsilon_{RH}$ : Extinktionskoeffizient des Phytochroms mit protoniertem Chromophor  
 $\varepsilon_{R^-}$ : Extinktionskoeffizient des Phytochroms mit deprotoniertem Chromophor

(2.65), (2.68) und (2.69) in (2.67) ergeben

$$A(pH) = \varepsilon_{RH} [R]_{ges} d - \varepsilon_{RH} [R^-] d + \varepsilon_{R^-} [R^-] d \quad (2.70)$$

(2.66) in (2.70) ergibt

$$A(pH) = \varepsilon_{RH} [R]_{ges} d - \varepsilon_{RH} \frac{[R]_{ges}}{1 + 10^{pK_a - pH}} d + \varepsilon_{R^-} \frac{[R]_{ges}}{1 + 10^{pK_a - pH}} d \quad (2.71)$$

(2.68) und (2.69) in (2.71) ergeben (2.62), mit  $A_{RH} \equiv d[R]_{ges}\varepsilon_{RH}$  und  $A_{R^-} \equiv d[R]_{ges}\varepsilon_{R^-}$ .

### 2.2.11 Verwendete Software

Origin 7.5, Microcal Inc. Northhampton, Massacusetts, USA.

Mathematica 3, Wolfram Research Champaign USA.

Pymol, Delano Scientific, San Carlos.

Chem Window 3.0.2, Soft Shell international Grand Junction USA.