

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Steuerung der Primärreaktion von Bakteriorhodopsin

3.1.1 Ergebnisse an bR wt und bR Mutanten

Die Absorptionsdifferenzmessungen an Bakteriorhodopsin (bR) und den bR-Mutanten wurden alle mit dem Weißlicht-Weißlicht Aufbau (siehe Abschnitt 2.3.1) durchgeführt. Um eine möglichst hohe relative Genauigkeit zwischen den ermittelten Zeitkonstanten der aufgenommenen Kinetiken zu gewährleisten, wurden die Kinetiken von wt und den verschiedenen Mutanten direkt hintereinander - ohne Änderung des Versuchsaufbaus - aufgenommen. Nach Anregung bei 580 nm wurde die Dynamik im spektralen Bereich zwischen 420 und 760 nm und bei 900 nm untersucht.

3.1.1.1 Kinetiken

In Abbildung 3.1 sind ausgewählte Kinetiken und Fits von bR und Mutanten bei Abtastwellenlängen von 480, 640, 700 und 900 nm abgebildet. Fittet man die Kinetiken mit einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der *Systemresponse* gefaltet sind, so ergeben sich Zeitkonstanten von 520 ± 50 fs und $2,9 \pm 0,8$ ps für wt, G231C und R82A/G231C. Die 500 fs Zeitkonstante wird dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes (ESA) und die 3 ps Zeitkonstante der Bildung des K-Intermediates zugeordnet. Die Kinetiken von R82A weisen im Bereich der

Probe	pH	λ_{max}/nm	τ_1/ps	τ_2/ps	A_1	A_2
wt	7.0	568	0.55(5)		1.0	
wt	10.0	568	0.53(5)		1.0	
R82A/G231C	7.0	567	0.57(5)		1.0	
R82A/G231C	10.0	567	0.54(5)		1.0	
G231C	7.0	568	0.57(5)		1.0	
R82C	10.0	565	0.48(5)	4.9(1.0)	0.83(2)	0.17(2)
R82Q	10.0	560	0.43(5)	2.5(6)	0.85(2)	0.15(3)
R82A	10.0	562	0.51(5)		1.0	

Tabelle 3.1: Purpurne bR Formen ($\lambda_{max} \approx 570 nm$). Aufgeführt sind die experimentellen Parameter wie pH und Grundzustands-Absorptionsmaximum in der lichtadaptierten Form und die Zerfallszeiten τ_i mit Amplituden A_i im Bereich der Absorption des angeregten Zustandes bei 480 nm. In Klammern sind die Fehler angegeben, die sich auf die letzte(n) Ziffern beziehen. Die Fits wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen, die mit der *Systemresponse* gefaltet wurden, durchgeführt. Alle aufgeführten Proben weisen eine Salzkonzentration von 15 mM KCl auf.

ESA (480 nm) und der stimulierten Emission (SE, 900 nm) zwei Zeitkonstanten auf, die bei $1,7 \pm 0,2 ps$ und $6,4 \pm 1,2 ps$ liegen. Es ist bekannt, dass eine Änderung der Ladungsverteilung in der Retinalbindungstasche einen starken Einfluss auf den Zerfall der ESA hat. Mutationen (im Protein) an den Positionen 85, 212 (jeweils Asparaginsäuren, negative Ladung) und 82 (Arginin, positive Ladung), die die Ladung entfernen, verlangsamen den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes [8].

3.1.1.2 Differenzspektren

Trägt man die Amplituden der Kinetiken zu festen Zeitpunkten gegen ihre Abtastwellenlänge auf, so erhält man Differenzspektren, die in Abbildung 3.2 dargestellt sind. Daran können einerseits die spektralen Eigenschaften der Zustände abgelesen werden, die innerhalb der ersten 15 ps (bzw. 18 ps) erzeugt werden und andererseits können sie direkt mit denen des wt verglichen werden. Alle Differenzspektren werden durch das Bleichsignal der elektronischen Grundzustandsabsorptionsbande ($\approx 520 - 640 nm$), die Absorption des elektronisch angeregten Zustandes (420-540 nm) und die Absorption des Photoproduktes (600-700 nm) bestimmt. Das Bleichsignal und die ESA steigen mit der *Systemresponse* an. Mit dem Zerfall der ESA tritt die Absorption der Photoprodukte auf, die auf der Zeitskala des Experimentes (bis 40 ps) einen konstanten Wert annehmen.

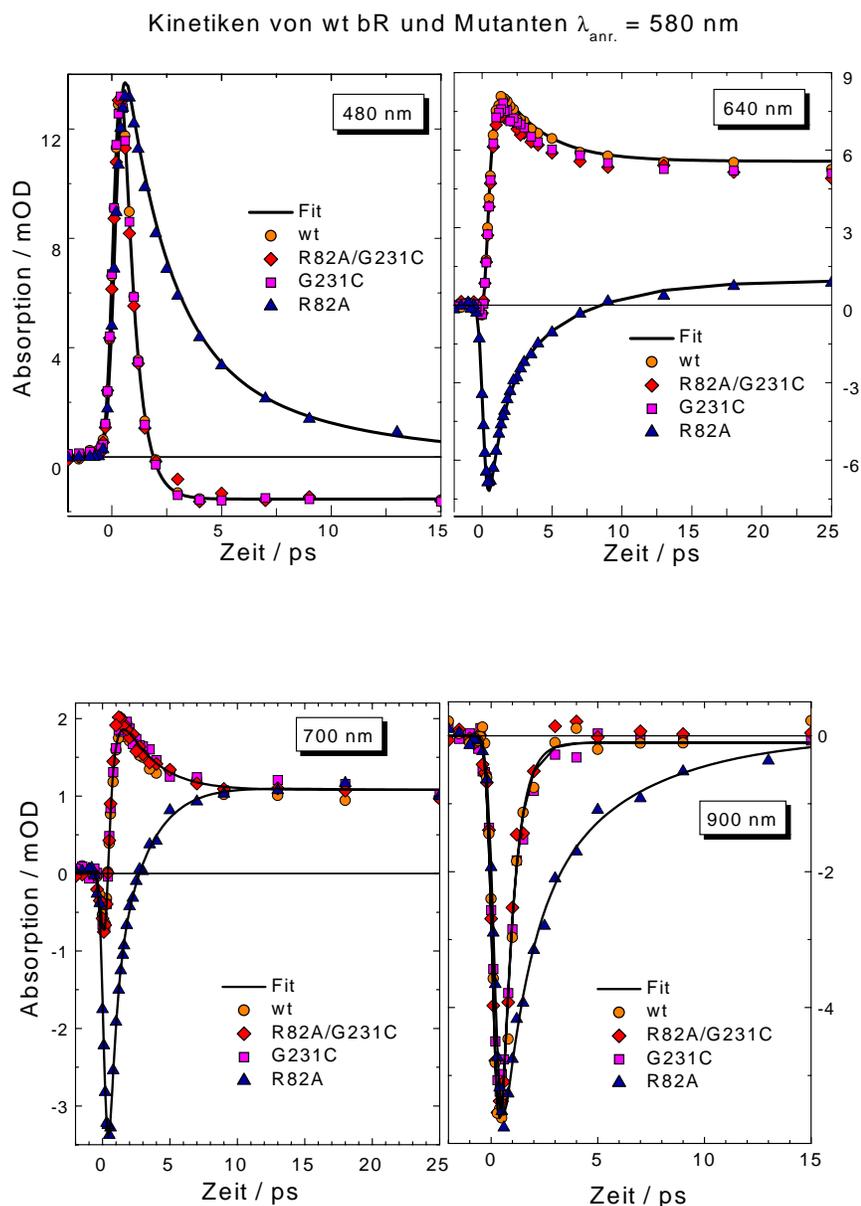


Abbildung 3.1: Ausgewählte Kinetiken und Fits von bR wt und Mutanten G231C, R82A/G231C und R82A. $\lambda_{anr.} = 580 \text{ nm}$; neutraler pH; 15 mM KCl; Zimmertemperatur. Die Kinetiken von wt (Kreise), G231C (Quadrate) und R82A/G231C (Rauten) stimmen sehr gut miteinander überein. Die Kinetik der R82A Mutante zeigt einen langsameren Zerfall bei 480 und 900 nm und weicht auch bei den anderen Abtastwellenlängen von den übrigen Kinetiken ab. Die Parameter der Fits sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführt.

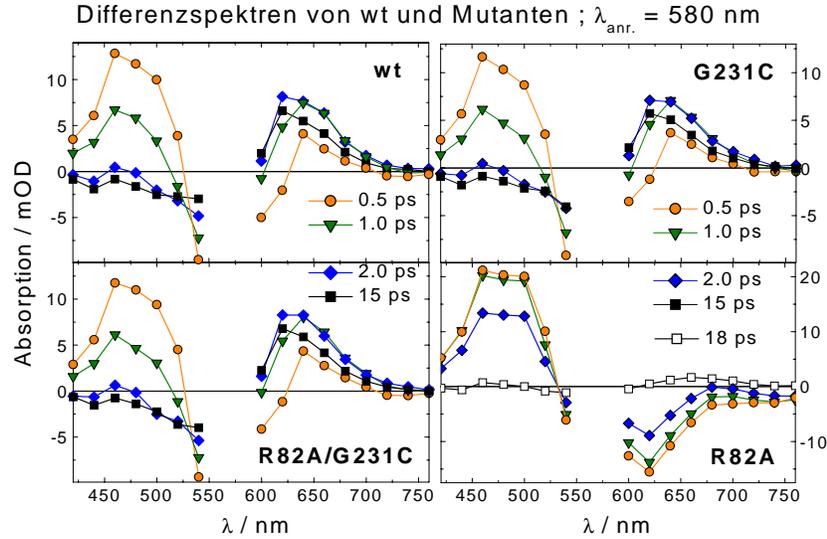


Abbildung 3.2: Differenzspektren von wt, G231C, R82A/G231C, R82A zu ausgewählten Verzögerungszeiten. $\lambda_{anr.} = 580 \text{ nm}$; pH 7; 15 mM KCl. Kreise : 0,5 ps; Dreiecke : 1 ps; Rauten : 2 ps; Quadrate geschlossen : 15 ps; Quadrate offen : 18 ps; Die Kinetiken zu den Differenzspektren sind direkt hintereinander aufgenommen worden um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Spektrale Beiträge: ESA: 420..540 nm; Bleichsignal: 520..640 nm (blaue Formen etwa 30 nm rotverschoben); Photoproduktabsorption: 600..700 nm.

3.1.1.3 Doppelmutante R82A/G231C

In R82A, in der bei physiologischem pH die D85 protoniert vorliegt, beobachtet man eine Verlangsamung des Zerfalls des elektronisch angeregten Zustandes. Die Differenzspektren der R82A weisen daher deutliche Unterschiede zu wt auf. Die Spektren von wt, G231C und R82A/G231C sind dagegen im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch, was bedeutet, dass durch die zusätzliche Mutation von G231C zur R82A die Reaktionsdynamik wieder wie im wt abläuft. Die Wiederherstellung der wt Reaktionsdynamik in der Doppelmutante ist auch gut in den Kinetiken von wt, R82A, G231C und R82A/G231C (alle bei pH 7) bei 480 und 900 nm in Abbildung 3.1 zu sehen. Der Verlauf der Kinetiken folgt der Korrelation, die zwischen dem Protonierungszustand der D85 und dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes in [7] und [8] gefunden wurde. In R82A bei pH 7 führt die protonierte D85 zu einer Verlangsamung des Zerfalls der ESA, während in der Doppelmutante R82A/G231C bei pH 7 mit deprotonierter D85 eine Zeitkonstante wie im wt zu beobachten ist (siehe auch Tabellen 3.1 und 3.2). Der Zerfall des angeregten Zustandes von R82A/G231C stimmt sehr gut mit dem des wt überein. Aus der quantitativen Übereinstimmung der Differenz-

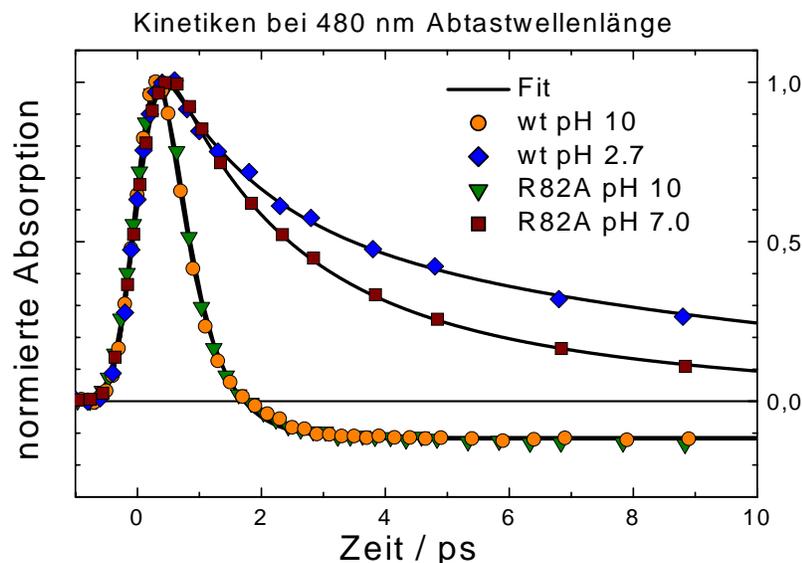


Abbildung 3.3: Kinetiken von bR wt pH 10.0 (Kreise), R82A pH 10.0 (Dreiecke), wt pH 2.7 (Rauten), R82A pH 7.0 (Quadrate) und Fits mit den Parametern aus Tabellen 3.1 und 3.2. Alle Kinetiken wurden bei einer Abtastwellenlänge von 480 nm aufgenommen und mit 580 nm angeregt.

spektren von wt und der Doppelmutanten im Bereich der ESA, des Bleichsignals und der Photoproduktabsorption kann geschlossen werden, dass auch die Quantenausbeute der all-trans zu 13-cis Isomerisierung für R82A/G231C dieselbe ist wie für wt, nämlich ca. 64%. Deshalb sollte die Dynamik der primären trans-cis Photoisomerisierung des Retinalchromphors für beide Systeme gleich sein.

3.1.1.4 Systematischer Vergleich verschiedener Einflüsse

Zur weiteren Charakterisierung der Revertante R82A/G231C und um mehr über den Einfluss der Ladungen auf die schnelle Photoisomerisierung zu lernen, sind Parameter wie der pH und die Ionenkonzentration für wt, R82A und R82A/G231C verändert worden. Um zu testen, in wie weit spezifische sterische Effekte der positiven Ladung des Arginin in Position 82 eine Rolle spielen, wurde die Mutante R82C untersucht, an deren Thiolgruppe durch Zugabe von Hg^{2+} Ionen (R82C- Hg^+) eine positive Ladung positioniert werden konnte, die nicht dieselbe sterische Position wie im wt einnimmt (vgl. Länge der Seitenketten zwischen Arginin und Cystein in Abbildung A.1). Die einzelnen experimentellen Bedingungen wie pH, Ionenkonzentration und Modifikationen (z.B. R82C- Hg^+) sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführt. In den Abbildungen 3.1, 3.3, 3.4 und 3.5 sind die Kinetiken

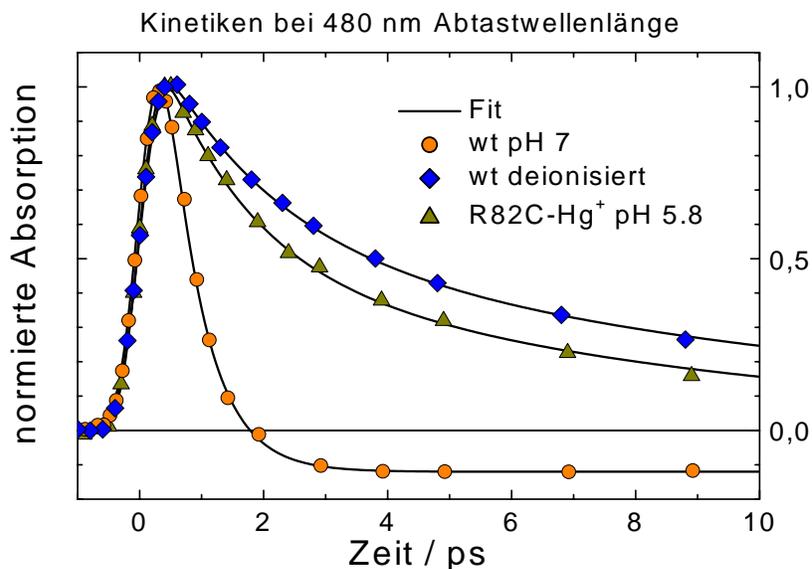


Abbildung 3.4: Kinetiken von bR wt pH 7.0 (Kreise), wt deionisiert (Rauten), und R82C- Hg^+ pH 5.8 (Dreiecke) und Fits mit den Parametern aus Tabellen 3.1 und 3.2. Alle Kinetiken wurden bei einer Abtastwellenlänge von 480 nm aufgenommen und bei 580 nm angeregt.

des transienten Absorptionssignals bei 480 nm Abtastwellenlänge für verschiedene Proben mitsamt ihren Fits, die sich mit den Parametern aus Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 ergeben, dargestellt. In diesem spektralen Bereich repräsentieren die Absorptionssignale fast ausschließlich die Absorption des elektronisch angeregten Zustandes, da Beiträge von anderen Zuständen, wie z.B. des Produktes oder der Grundzustandsabsorption vernachlässigbar klein sind. Aus diesem Grund wird der Zerfall des Signals bei 480 nm als Maß für den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes in den elektronischen Produkt-Grundzustand gewertet. In den Abbildungen 3.1 und 3.3 sind Kinetiken bei 480 nm von bR wt, R82A, G231C und R82A/G231C bei verschiedenem pH abgebildet. Alle Signale zeigen einen schnellen Anstieg, der durch die Breite der *Systemresponse* bestimmt ist und einen schnellen Zerfall im Fall von wt (pH 7 und 10), G231C (pH 7), R82A/G231C (pH 7) und R82A (pH 10). Die Signalamplituden nehmen bei längeren Zeiten einen kleinen negativen Wert an, der durch das Bleichsignal des elektronischen Grundzustands verursacht wird. Die Kinetiken von R82A (pH 7) und wt (pH 2.7) weisen einen deutlich verlangsamten Zerfall auf. Die 480 nm Kinetiken in den Abbildungen 3.1 und 3.3 sind als repräsentative Beispiele für Proben mit deprotonierter D85 und Absorptionsmaximum bei 570 nm (purpurne Form, schneller Zerfall) und Proben mit protonierter D85 und Absorptionsmaximum um 600 nm (blaue Form, langsamer Zerfall) anzusehen. Variiert man die Messbedingun-

Probe	pH	λ_{max}/nm	τ_1/ps	τ_2/ps	A_1	A_2
R82A	7.0	≈ 600	1.7(2)	6.4(8)	0.66(5)	0.34(5)
R82A	5.8	≈ 600	1.7(3)	6.4(1.2)	0.64(9)	0.36(10)
R82C	7.0	585	1.8(2)	12.4(9)	0.57(3)	0.43(3)
R82C	5.8	≈ 590	1.5(2)	8.4(9)	0.59(5)	0.41(5)
R82C- Hg^+	5.8	585	1.4(2)	8.3(8)	0.59(4)	0.41(4)
wt	2.7	603	1.8(5)	12(3)	0.51(4)	0.49(4)
R82A/G231C	2.7	602	2.5(6)	21.8(7.3)	0.66(11)	0.34(9)
wt BM	≈ 5	602	1.9(3)	11.8(7)	0.53(2)	0.47(2)
wt BM Ca^{2+}	≈ 5	602	1.7(3)	13.6(1.6)	0.54(4)	0.46(5)
R82A/G231C BM	≈ 5	602	1.8(2)	12.4(8)	0.49(1)	0.51(1)

Tabelle 3.2: Blaue bR Formen ($\lambda_{max} \approx 600 nm$). Aufgeführt sind die experimentellen Parameter wie pH und Grundzustands-Absorptionsmaximum sowie die Fitresultate, d.h. Zerfallszeiten τ_i mit Amplituden A_i im Bereich der Absorption des angeregten Zustandes, bei 480 nm. Die Fits wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen durchgeführt, die mit der *Systemresponse* gefaltet wurde. Alle aufgeführten Proben, bis auf die deionisierten (BM), weisen eine Salzkonzentration von 15 mM KCl auf. Bei wt BM Ca^{2+} wurden der deionisierten Probe äquimolar Kalziumionen zugeführt.

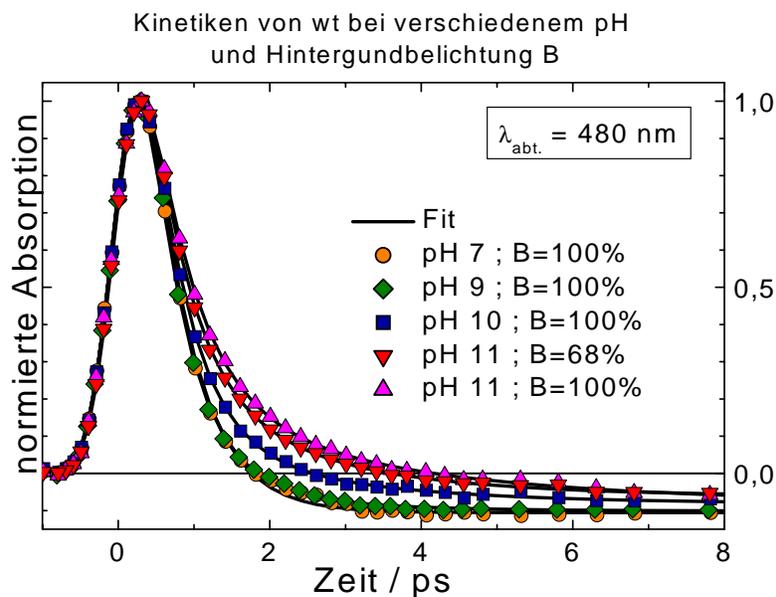


Abbildung 3.5: Kinetiken mit Hintergrundlicht B von bR wt pH 7.0 (Kreise), pH 9.0 (Rauten), pH 10.0 (Quadrate), pH 10.9 (Dreiecke nach unten), pH 10.9 (Dreiecke nach oben) und Fits mit den Parametern aus Tabellen 3.3. Alle Kinetiken wurden bei einer Abtastwellenlänge von 480 nm aufgenommen und bei 580 nm angeregt. Die Proben wurden mit kontinuierlichem Hintergrundlicht (B) im Spektralbereich von 550..760 nm bestrahlt.

Probe	pH	τ_1 /ps	τ_2 /ps	A_1	A_2	Bel.
wt	7.0	0.55(5)		1.0		
R82A/G231C	7.0	0.57(5)		1.0		
wt	7.0	0.55(2)		1.0		100%
wt	9.0	0.53(2)		1.0		
wt	9.0	0.48(3)	1.4(7)	0.93(1)	0.07(6)	100%
wt	10.0	0.53(5)		1.0		
wt	10.0	0.50(3)	2.1(5)	0.90(3)	0.10(3)	100%
R82A/G231C	10.0	0.54(5)		1.0		
R82A/G231C	10.0	0.54	1.7(2)	0.85(3)	0.15(2)	100%
wt	10.9	0.57(2)		1.0		
wt	10.9	0.52(3)	1.9(2)	0.81(2)	0.19(3)	68%
wt	10.9	0.52	1.9	0.76(1)	0.24(1)	100%

Tabelle 3.3: Purpurne bR Formen ($\lambda_{max} \approx 570 \text{ nm}$) in Abhängigkeit vom pH und Hintergrundbelichtung (Bel.). Aufgeführt sind die experimentellen Parameter wie pH und Hintergrundbelichtung (Bel.) und die jeweiligen Zerfallszeiten τ_i mit Amplituden A_i im Bereich der Absorption des angeregten Zustandes bei 480 nm. Die Fits wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen durchgeführt, die mit der *Systemresponse* gefaltet wurden. Alle aufgeführten Proben weisen eine Salzkonzentration von 15 mM KCl auf. Wenn kein Eintrag unter Bel. aufgeführt ist, wurde während der Messung keine Hintergrundbelichtung eingeschaltet.

gen dahingehend, dass die Messungen mit Hintergrundbelichtung (550..760 nm) bei hohem pH durchgeführt werden (siehe Abbildung 3.5), so tritt in wt und R82A/G231C zur Zerfallszeit $\tau_1 = 0,5 \text{ ps}$ eine zweite Zerfallszeit $\tau_2 = 1.9 \pm 0.2 \text{ ps}$ auf, deren kleine Amplitude mit steigendem pH und Intensität der Hintergrundbelichtung wächst, ohne die Zeitkonstante τ_1 zu beeinflussen (Tabelle 3.3). Da sich die Zeitkonstante τ_1 nicht ändert, liegt der Schluss nahe, dass unabhängig von der schnellen Zerfallszeit ein weiterer Zustand erzeugt wird, der mit der Zeitkonstante τ_2 zerfällt. Da bei hohem pH der Photozyklus von bR verlangsamt und zusätzlich mit der Hintergrundbelichtung die Menge an bR-Molekülen, die sich im Photozyklus befinden, erhöht wird, wächst der Mittelwert der Konzentrationen von langlebigen Intermediaten M und N stark an [72, 73, 74, 75]. Da das Absorptionsspektrum des M_{412} -Intermediats im Gegensatz zu dem des N_{560} -Intermediats kaum mit dem Spektrum des Anregungsimpulses bei 580 nm überlappt [76, 77, 78], liegt der Schluss nahe, dass die zweite Zerfallszeit τ_2 in wt und R82A/G231C (bei hohem pH mit Belichtung) auf die Anregung des N-Intermediats und den Zerfall seines elektronisch angeregten Zustandes zurückzuführen ist.

3.1.1.5 Purpurne und blaue Formen

In den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 sind die Ergebnisse der Analyse der Zerfallszeiten des elektronisch angeregten Zustandes für purpurne und blaue Formen aufgeführt. Sie können wie folgt zusammengefasst werden:

- **Purpurne Form:** G231C, R82A/G231C und wt sind purpurne Formen bei pH 7 und auch bei höherem pH. R82A, R82C und R82Q nehmen erst bei hohem pH (z.B. pH 10) die purpurne Form an.

Alle purpurne Formen sind durch eine kurze Zerfallszeit des angeregten Zustandes τ_1 im Bereich von 0.43 bis 0.57 ps mit großer Amplitude ausgezeichnet. Die Zeitkonstante τ_1 weist eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf, da im Bereich des experimentellen Fehlers von 0.05 ps um den Mittelwert von 0.52 ps keine Unterschiede der schnellen Zerfallszeit τ_1 für die verschiedenen Proben gefunden wurden (siehe Tabellen 3.1 und 3.2).

Eine zweite Zerfallskomponente τ_2 des elektronisch angeregten Zustandes mit kleiner Amplitude kann unter normalen Messbedingungen (siehe Abschnitt 2.7) nur in R82Q (pH 10, $\tau_2 = 2.5 \pm 0.6$ ps) und R82C (pH 10, $\tau_2 = 4.9 \pm 1.0$ ps) beobachtet werden. Variiert man die Messbedingungen dahingehend, dass sich das Intermediat N anreichern kann, so tritt in wt und R82A/G231C eine zweite Zerfallszeit $\tau_2 = 1.9 \pm 0.2$ ps auf.

- **Blaue Form:** R82A und R82C sind blaue Formen bei oder nahe neutralem pH (5.8 und 7 und 15 mM KCl). R82A/G231C und wt werden bei saurem pH (2.7) und als deionisierte Probe zu blauen Formen.

Der angeregte Zustand aller blauen Formen zerfällt biphasisch mit derselben kurzen Zerfallszeit $\tau_1 = 1.7 \pm 0.3$ ps und einer längeren Zerfallszeit τ_2 , die im Bereich von etwa 6 bis 12 ps liegt. Auffällig ist der Unterschied der Variation der Zeitkonstanten von τ_1 und τ_2 , die bei τ_1 um 18% liegt und sich bei τ_2 bis um den Faktor 2 ändert. Die Zerfallszeit τ_1 der blauen Formen ist im Vergleich zu den purpurnen Formen signifikant länger.

Wt bei pH 2.7, deionisierter wt und deionisierte R82A/G231C zeigen im Rahmen des experimentellen Fehlers dieselben Zerfallszeiten τ_2 (von 12 ± 3 , 11.8 ± 0.7 und 12.4 ± 0.8 ps). Der Zerfall des elektronisch angeregten Zustands von R82A weist die kürzeste Zeitkonstante $\tau_2 = 6.4 \pm 1.2$ ps aller (gemessenen) blauen Formen auf. R82C bei pH 7.0 und pH 5.8 weisen mit 12.4 ± 0.9 ps und 8.4 ± 0.9 ps längere Zerfallszeiten τ_2 auf.

Wie in Abbildung 3.1 bei 480 nm zu sehen ist, wird der Zerfall der ESA in R82A (auf 1.7 ps) verlangsamt, wenn die positive Ladung in Position 82 fehlt. Der gleiche Effekt ist auch in der Mutanten R82C zu beobachten, die bei pH 5.8 und 7 den blauen Formen zuzuordnen ist und τ_1 -Zeitkonstanten von 1.5 und 1.8 ps aufweist. Eine positive Ladung kann in R82C als R82C- Hg^+ an Position 82 wieder eingefügt werden [70]. Dennoch ist in R82C- Hg^+ bei pH 5.8 nur eine "lange" Zerfallszeit τ_1 von 1.4 ± 0.2 ps zu beobachten. In Abbildung 3.4 ist die Kinetik von R82C- Hg^+ (pH 5.8) und zum Vergleich die Kinetiken von wt (pH 7) und deionisierter wt abgebildet. Alle drei Proben weisen eine positive Ladung in Position 82 auf, zeigen aber unterschiedliche τ_1 Zerfallszeiten von: 1.4 ps (R82C- Hg^+ , blaue Form), 1.9 ps (wt deionisiert, blaue Form) und 0.55 ps (wt pH 7, purpurne Form).

3.1.2 Diskussion

3.1.2.1 Wechselwirkung zwischen Retinalisomerisierung und äußeren Ladungen

Die in den Tabellen 3.1,3.2 und 3.3 aufgeführten Ergebnisse zeigen eine strenge Korrelation des Protonierungszustands von D85 mit dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustands $\tau_1 = 0,5$ ps (D85 deprotoniert) und $\tau_1 = 1,7$ ps (D85 protoniert). Daraus kann geschlossen werden, dass die Ladung von D85 für die Doppelmutante R82A/G231C und die anderen untersuchten Mutanten einen katalytischen Einfluss auf die Kinetik des elektronisch angeregten Zustands ausübt [8]. Der Mechanismus, der diese Korrelation verursacht, liegt in der Wechselwirkung zwischen Retinalchromophor und der Ladung von D85 begründet, die selber durch spezifische Randbedingungen der Retinalbindungstasche beeinflusst wird. Prinzipiell können die elektronischen Potentialflächen des Chromophors, die zur Isomerisierung beitragen, aus den Zuständen des freien Retinalchromophors und der Proteinstruktur berechnet werden [79, 80]. Eine spezifische Rolle kommt dabei der D85 zu [8, 81], deren negative Ladung, die nur wenige Angström (4,1) von der Retinal-Polyenkette entfernt ist, lokal mit dem delokalisierten π -Elektronensystem wechselwirkt. In einem System wie bR, das eine protonierte Schiff'sche Base aufweist, kann die positive Ladung des Retinalchromophors an einer spezifischen Lage auf der Polyenkette durch eine geeignet positionierte negative Ladung stabilisiert werden. Dadurch wird im Protein einerseits eine spezifische Chromophorkonfiguration des Grundzustandes bR_{570} , die all-trans Konfiguration, durch das Gegenion gegenüber der thermischen Isomerisierung (Dunkelreaktion) stabilisiert und andererseits die Photoisomerisierungsrate um eine spezifische C=C Doppelbindung ($C_{14} = C_{15}$) im angeregten Zustand erhöht. Mit diesem Modell sollte eine Ladungsänderung in der Chromophorbindungstasche die Elektronendichten an den C-C Bindungen und die Isomerisierungsdynamik verändern. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse bestätigen auf einer breiten Basis von Mutationen, pH- und Ionenkonzentrationsänderungen dieses qualitative Modell. Darüber hinaus lassen sich nun spezifische Aussagen treffen, die im folgenden aufgeführt werden:

3.1.2.2 Doppelmutante R82A/G231C

Die Ergebnisse an der Doppelmutante R82A/G231C zeigen, dass selbst in einer Bindungstasche, in der die Ladungsverteilung in Bezug auf bR_{570} stark geändert

wurde¹, eine Korrelation zwischen der Deprotonierung der D85 und der kurzen Zerfallszeit der ESA bei physiologischem pH besteht. Es ist bekannt, dass der pK der D85 durch Parameter wie räumliche Ladungsverteilung, Wassermoleküle und andere polarisierbare Gruppen in der Bindungstasche stark beeinflusst werden kann. In der Einfachmutante R82A ist eine Änderung der Ladungsverteilung durch Mutation realisiert worden, die zu einem erhöhten pK Wert der D85 führt. In der Doppelmutante R82A/G231C liegt die interessante Situation vor, dass die zweite Mutation (G231C), die sich weit entfernt von der Bindungstasche befindet, den pK der D85 wieder zu einem Werte nahe dem in bR_{570} erniedrigt. Daraus ergibt sich, dass in der Doppelmutante die für die kurze Zerfallszeit $\tau_1 = 0,52$ ps und für einen pK wie in bR_{570} notwendige Mikroumgebung wiederhergestellt ist. Der zugrunde liegende Mechanismus muss eine Verschiebung von Ladungen oder geladenen, teilgeladenen oder polarisierbaren Gruppen aufweisen. An diesem Prozess könnten zum Beispiel Aminosäureseitenketten wie D85, D212, R82, Y185, Y57 und T89, die Teil des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes sind [33, 82, 15], Wassermoleküle oder das Proton an der Schiff'schen Base beteiligt sein. Eine deprotonierte Schiff'sche Base im elektronischen Grundzustand von R82A/G231C kann aufgrund der nicht beobachteten Blauverschiebung des Absorptionsmaximums, wie sie im M_{412} -Intermediat auftritt, ausgeschlossen werden.

3.1.2.3 Mechanismus der molekularen Umordnung in der Doppelmutante

Auf der Grundlage von Grundzustandsabsorptionsspektren, Photozykluskinetiken und der Kinetik der Protonenaufnahme und -abgabe von wt, R82A und R82A/G231C ist ein Modell von Alexiev et al. [83] für eine solche Verschiebung von Ladungen vorgeschlagen worden. Dieses Modell erklärt das wt-ähnliche Verhalten der Doppelmutante R82A/G231C damit, dass eine Umorientierung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes und der D212 stattfindet, die dazu führt, dass sich ein Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk ohne D212 und R82 ausbildet, dass dem in wt bR äquivalent ist. Mit der vereinfachten Annahme, dass sich R82 (positiv) und D212 (negativ) gegenseitig in bR_{570} kompensieren, führt die Mutation R82A dazu, dass durch die Wegnahme der positiven Ladung die verbleibende negative Ladung von D212 den pK der D85 erhöht. Da auch in R82A/G231C die positive Ladung von R82 fehlt, muss der Einfluss der negativen Ladung von D212 auf D85 durch andere Effekte, z.B. Konformationsänderungen des Proteins oder

¹Die positive Ladung in Position 82 fehlt (R82A).

Abschirmung abgeschwächt werden, so dass sich der pK der D85 wieder (zu wt-Werten) reduziert und ein schneller Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes ($\tau_1 = 0.52$ ps) bei pH 7 ermöglicht wird.

Dieses Modell impliziert, dass neben der R82 wahrscheinlich auch D212 nicht zu dem minimalen Satz von kritischen Aminosäuren gehört, die einen wt-ähnlichen pK der D85 und somit einen schnellen Zerfall von 0,52 ps des elektronisch angeregten Zustandes bei physiologischem pH ermöglichen. Untersuchungen an der Doppelmutante R82Q/D212N [84] unterstützen diese Schlußfolgerung, da sie teilweise wt-ähnliches Verhalten des Photozyklusses und des Protonentransportes aufweist, der ein funktionsfähiges Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk voraussetzt.

3.1.2.4 R82C-Hg⁺

Aus den Ergebnissen von R82A/G231C folgt, dass die D85 auch ohne die positive Ladung in Position 82 bei physiologischem pH deprotoniert sein kann. Umgekehrt gilt, dass mit positiver Ladung in Position 82 bei pH 7 (15 mM KCl) die D85 nicht deprotoniert sein muss. Dies geht aus den Ergebnissen von *R82C - Hg⁺* hervor, die bei pH 5.8 eine blaue Form aufweist. In Abbildung 3.4 sind Kinetiken bei 480 nm von *R82C - Hg⁺* bei pH 5.8 zusammen mit Kinetiken von wt bei pH 7 und deionisiertem wt abgebildet. Für alle drei Proben weist die Aminosäure in Position 82 eine positive Ladung auf, wobei sich zwischen *R82C - Hg⁺* und R82 nur die Länge der Aminosäureseitenketten ändert (*Cystein - Hg⁺* ist kürzer als Arginin), so dass geschlossen werden kann, dass der Protonierungszustand der D85 und damit der Zerfall der ESA im wt kritisch von der Lage der positiven Ladung in Position 82 abhängt.

3.1.2.5 Biphasische Dynamik

In Tabelle 3.2 tritt in allen blauen Formen neben der kurzen Zerfallszeit τ_1 des elektronisch angeregten Zustands eine zweite Komponente τ_2 mit signifikanter Amplitude auf. Verschiedene Erklärungen für das Auftreten mehrerer Zerfallszeiten der ESA können hier zutreffen. Am wahrscheinlichsten ist die Existenz von zwei Isomeren all-trans und 13-cis des Retinalchromophors im elektronischen Grundzustand [85, 86], wobei aber andere Prozesse, wie z.B. eine Verzweigung des Reaktionsweges im angeregten Zustand, wie sie für die Reaktionsdynamik von Halorhodopsin (hR) diskutiert wird [87, 88], nicht ausgeschlossen werden kann.

Um eine Zuordnung der biphasischen Dynamik zur all-trans und 13-cis Konfiguration zu treffen, können Messungen an Grundzustandsintermediaten hilfreich sein. Bei hohem pH kann das N-Intermediat angereichert und angeregt werden [78]. Die Zerfallszeit seines elektronisch angeregten Zustands wurde in wt und R82A/G231C zu 1.9 ± 0.2 ps bestimmt (siehe Tabelle 3.3). Da der Retinalchromophor im N-Intermediat in einer 13-cis Konfiguration mit protonierter Schiff'schen Base und protonierter D85 vorliegt [24], liegt die Vermutung nahe, dass die schnelle Zerfallszeit $\tau_1 = 1.7$ ps in den blauen Formen einem Chromophor mit 13-cis Konfiguration zugeordnet werden kann. Dies steht im Widerspruch zu der Zuordnung von Logunov et al. [85], der die Zerfallszeit τ_1 einer all-trans und τ_2 einer 13-cis Konfiguration des Retinalchromophors zugeordnet hat. Deshalb müssen entweder noch weitere Aspekte der Struktur der Bindungstasche berücksichtigt werden oder es muss die Zuordnung der Zerfallszeiten der ESA zu den Grundzustandsisomeren all-trans und 13-cis neu überdacht werden.

Der Gesamtvergleich der in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 aufgeführten Zeitkonstanten liefert eine Verteilung der Zerfallszeiten $\tau_1 = 0.52 \pm 0.05$ ps (purpurne Form) und $\tau_1 = 1.7 \pm 0.3$ ps (blaue Form), die sehr schmal ist, wohingegen τ_2 der blauen Form, selbst nur unter R82 Mutanten, eine starke Variation der Zerfallszeit von etwa 6 bis 12 ps aufweist. Die Stabilität der Zeitkonstante τ_1 bei Variation der chemischen Spezifikationen der Probe durch Mutation, pH oder Ionenkonzentration unterstützt die Hypothese, dass hauptsächlich der Protonierungszustand der D85 die Zeitkonstante τ_1 bestimmt. Da τ_2 im Gegensatz zu τ_1 eine breite Spanne von Zeitkonstanten bei Veränderung der molekularen Parameter aufweist, liegt der Schluss nahe, dass hier eine grundsätzlich anders geformte S_1 -Potentialoberfläche die Dynamik des ESA Zerfalls mit τ_2 bestimmt.

3.1.3 Zusammenfassung

Die wichtigsten Ergebnisse der zeitaufgelösten Absorptionsdifferenzmessungen im sub-ps und ps Zeitbereich an bR wt (Wildtyp) sowie Einfach- und Doppelmutanten von bR sind hier nochmals zusammengefasst:

- Es besteht für alle untersuchten Mutanten, pH Werte und Ionenkonzentrationen eine strenge Korrelation zwischen dem Protonierungszustand der D85 und der Zerfallszeit τ_1 des elektronisch angeregten Zustands des Retinalchromophors von 0,52 ps bei deprotonierter D85 und 1,7 ps bei protonierter D85.

- Die primären Photoreaktionen von bR wt und R82A/G231C stimmen von der Reaktionsdynamik bis hin zu der Quantenausbeute von $\approx 64\%$ in allen Einzelheiten (im Rahmen des experimentellen Fehlers) überein.
- In der Doppelmutante R82A/G231C ist gegenüber der Einfachmutante R82A eine Mikroumgebung des Chromophors wiederhergestellt, die eine Zerfallszeit von 0,52 ps bei physiologischem pH aufweist. Daraus folgt, dass die positive Ladung der Aminosäure Arginin in Position 82 nicht notwendig für den schnellen Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes mit 0,52 ps ist.
- Eine Hypothese ist, dass sich R82 (positiv geladen) und D212 (negativ geladen) in ihrem Einfluss auf die D85 gegenseitig kompensieren. In der Doppelmutante wird der Einfluss der D212 auf D85 mit der Mutation G231C durch Konformationsänderung des Proteins, z.B. Positionsänderung der D212 weg von der D85 oder Abschirmung der D212, so verändert, dass eine schnelle Zerfallszeit wieder beobachtet wird. Mit zusätzlichen Hinweisen aus der Doppelmutante R82Q/D212N, die ebenfalls Ansätze wt-ähnlichen Verhaltens aufweist, liegt es nahe, dass wahrscheinlich auch die D212 nicht notwendig für den schnellen Zerfall des elektronisch angeregten Zustands von 0,52 ps ist.
- Die räumliche Lage der positiven Ladung im Protein an Position 82 ist im wt kritisch für den Deprotonierungszustand der D85. Ihre Veränderung führt in R82C-Hg⁺ (geringerer Abstand der positiven Ladung zum Peptidgerüst) als Folge des geänderten Einflusses der D212 auf die D85 zu deren Protonierung und zur Änderung der Zerfallszeit τ_1 auf 1,7 ps bei physiologischem pH.
- In den blauen Formen mit protonierter D85 werden zwei signifikante Zerfallszeiten τ_1 und τ_2 beobachtet, die eine bemerkenswert unterschiedliche Breite in ihrer Verteilung aufweisen, was auf voneinander verschiedene Mechanismen der Reaktionssteuerung hindeuten könnte.
- Durch Anregung des Retinalchromophors im N-Intermediat konnte die Zerfallszeit seines elektronisch angeregten Zustands zu $1,9 \pm 0,2$ ps bestimmt werden. Da der Retinalchromophor im N-Intermediat in einer 13-cis Konfiguration mit protonierter Schiff'schen Base und protonierter D85 vorliegt und die Zerfallszeit erstaunlich gut mit τ_1 aus den blauen Formen übereinstimmt, kann dies einen Hinweis für eine Zuordnung von τ_1 in den blauen Formen zur 13-cis Konfiguration liefern.

3.2 Dynamik der Primärreaktion von Cph1-PEB

3.2.1 Einführung

Die lichtinduzierte Primärreaktion von Phytochrom, die eine Z,E-Isomerisierung um die C15-C16 Doppelbindung des Chromophors nach sich zieht, führt im Verlauf der Proteinrelaxation zur Photochromizität. Tauscht man den Chromophor PCB (oder PΦB) gegen PEB aus, der anstelle der $C_{15} = C_{16}$ Doppelbindung eine Einfachbindung besitzt, kann die Isomerisierung nicht stattfinden. Eine Photochromizität von Cph1 mit PEB (Cph1-PEB) als Chromophor tritt deshalb nicht auf [52] und die Anregungsenergie wird durch Fluoreszenz oder strahlungslose Prozesse abgebaut. Da der PEB-Chromophor in derselben Proteinumgebung gebunden ist wie der PCB-Chromophor, kann man durch Messungen am Cph1-PEB feststellen, welche Aspekte der Reaktionsdynamik durch die Isomerisierung bedingt sind und welche auch ohne die Möglichkeit zur Isomerisierung vorliegen. Ich habe die zeitaufgelösten Absorptionsdifferenzänderungen von Cph1-PEB in einem Zeitbereich bis 400 ps mit einer *Systemresponse* von etwa 80 fs untersucht. Die Messungen wurden mit dem NOPA-NOPA-Aufbau durchgeführt und die Abtastwellenlängen überdeckten den Bereich von 455 nm bis 710 nm.

3.2.2 Ergebnisse

In Abbildung 3.6 sind vier Kinetiken der Abtastwellenlängen 470, 565, 615 und 640 nm dargestellt. Alle Kinetiken zeigen dasselbe Verhalten: Um den Zeitnullpunkt gibt es einen schnellen, der *Systemresponse* folgenden Anstieg der Signals, das danach langsam abfällt. Die Vorzeichen der Amplituden sind verschieden, denn die Kinetik bei 470 nm weist eine positive Amplitude auf, während die anderen drei Kinetiken negative Absorptionsdifferenzen zeigen. Die Kinetiken lassen sich gut mit einer Exponentialfunktion fitten und die Fitkurven des besten globalen Fits sind als rote Kurven in Abbildung 3.6 zu sehen. Der optimale Wert des Fits ist 1078 ps und der Bereich, in dem zu 95% die Zerfallszeit liegt, beträgt 725..2045 ps (siehe Anhang A.2.2). In der Abbildung 3.7 ist die χ^2_{min} -Kurve in Abhängigkeit von der Zerfallszeit τ aus dem globalen Fit mit einer Exponentialfunktion dargestellt. Die Kurve ist das Ergebnis einer *exhaustive search* Analyse (siehe Anhang Abschnitt A.2.2) und zeigt deutlich, dass der Vertrauensbereich, in dem die Zerfallszeit zu 95% liegt, asymmetrisch um den optimalen Wert 1078 ps verteilt ist. Die Spanne des Vertrauensbereiches von 725 ps bis 2045 ps ist viel grö-

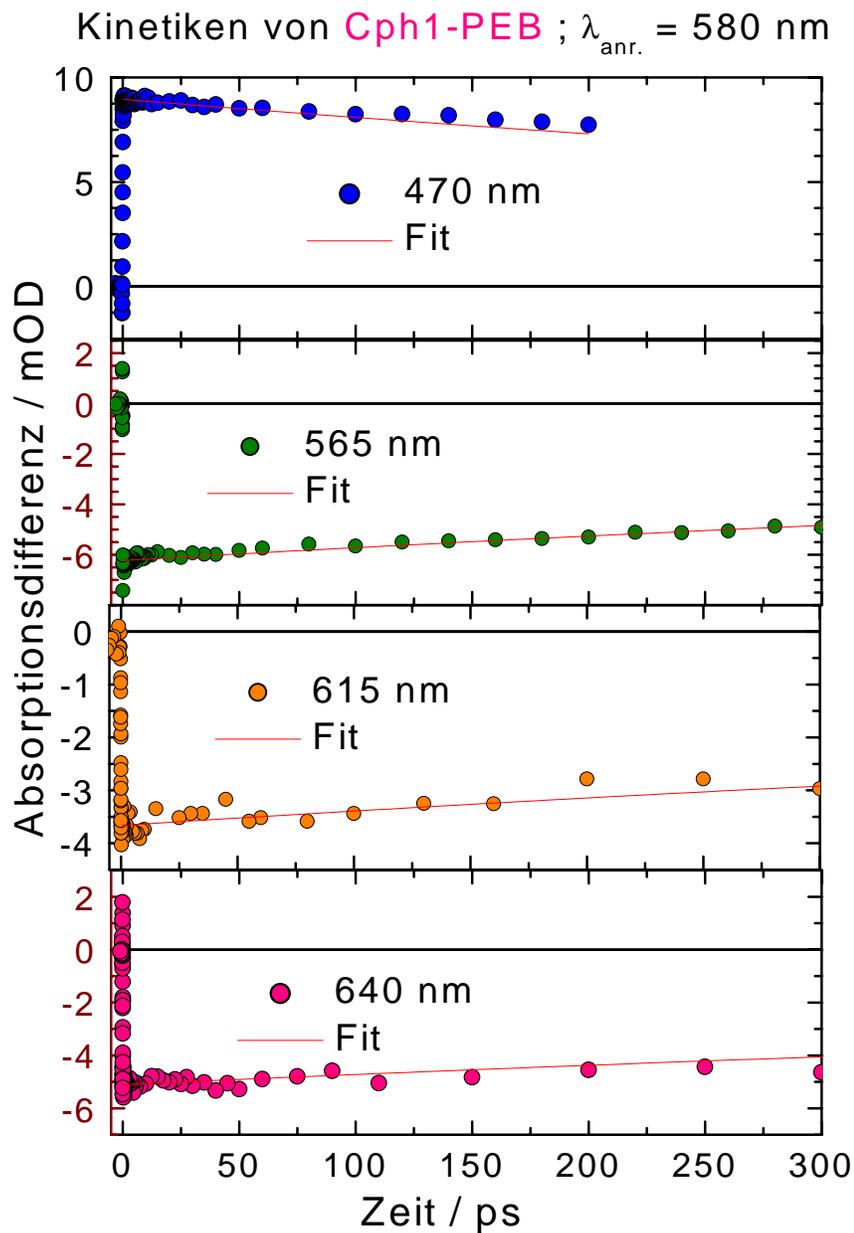


Abbildung 3.6: Die Grafik zeigt vier Kinetiken von Cph1-PEB bei Abtastwellenlängen von 470, 565, 615 und 640 nm (von oben nach unten). Zudem sind zu jeder Kinetik die Fitkurven (rote Linien) aus einem globalen Fit mit einer Exponentialfunktion dargestellt. Die Anregung von Cph1-PEB fand bei 580 nm mit einer *Systemresponse* von $\approx 80 \text{ fs}$ statt.

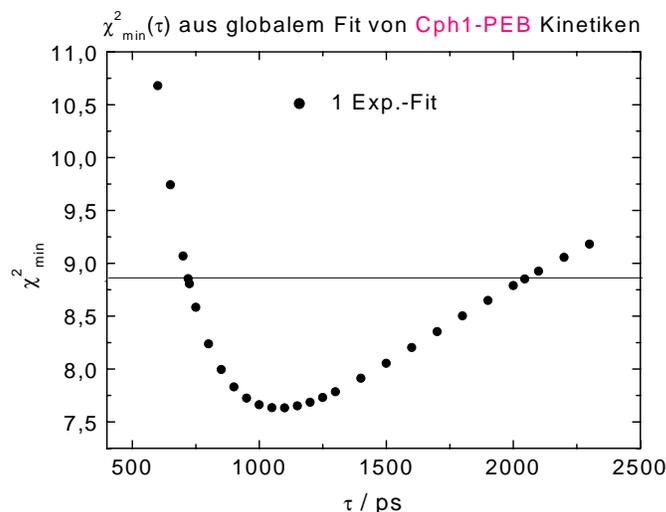


Abbildung 3.7: Die Abhängigkeit $\chi_{min}^2(\tau)$ ist hier dargestellt. Jeder Punkt entspricht dem Minimum eines globalen Fits über die Datensätze bei dem festgehaltenen Wert τ . Der waagerechte Balken gibt an, dass Werte die oberhalb liegen, mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 5% stimmen. Die Zerfallszeit liegt somit zu 95% im Zeitbereich von $\tau = 725..2045$ ps.

ßer als die direkt vom Fitprogramm (Origin) ausgegebene Standardabweichung von ± 56 ps, was viel realistischer ist, da nur Datenpunkte bis 400 ps gemessen wurden und somit eine genauere Bestimmung der Zerfallszeit nicht möglich ist.

Aus den Kinetiken, die bei verschiedenen Abtastwellenlängen aufgenommen wurden, können Absorptionsdifferenzspektren gewonnen werden. Dazu werden zu festen Zeiten Schnitte entlang der Wellenlängen durch die Kinetiken gelegt und die Amplituden der Schnittpunkte gegen die Abtastwellenlänge aufgetragen. Da sich im gemessenen Bereich der Verzögerungszeiten die Amplituden der Absorptionsdifferenzsignale kaum ändern, ist in Abbildung 3.8 nur das Differenzspektrum bei 60 ps dargestellt. Das Differenzspektrum weist zwei Bereiche unterschiedlicher Absorption auf. Im Bereich von 520 nm bis etwa 700 nm ist das Absorptionssignal negativ, während es im Bereich von 455 nm bis 520 nm positiv ist. Das negative Signal überdeckt beinahe den gesamten Bereich der Grundzustandsabsorption (GA) und erstreckt sich im längerwelligen Bereich darüber hinaus. Das legt den Schluss nahe, dass die negativen Signale durch Ausbleichen der Grundzustandsabsorption (rosa Linie in Abbildung 3.8) und durch stimulierte Emission² (SE, grüne Linie in Abbildung 3.8) verursacht werden. Addiert man beide Beiträge mit dem Amplitudenverhältnis 1:2,8 (GA:SE), so wird der Verlauf des experi-

²Wir gehen davon aus, dass sich die stimulierte Emission proportional zum Produkt aus Fluoreszenz und λ^3 verhält.

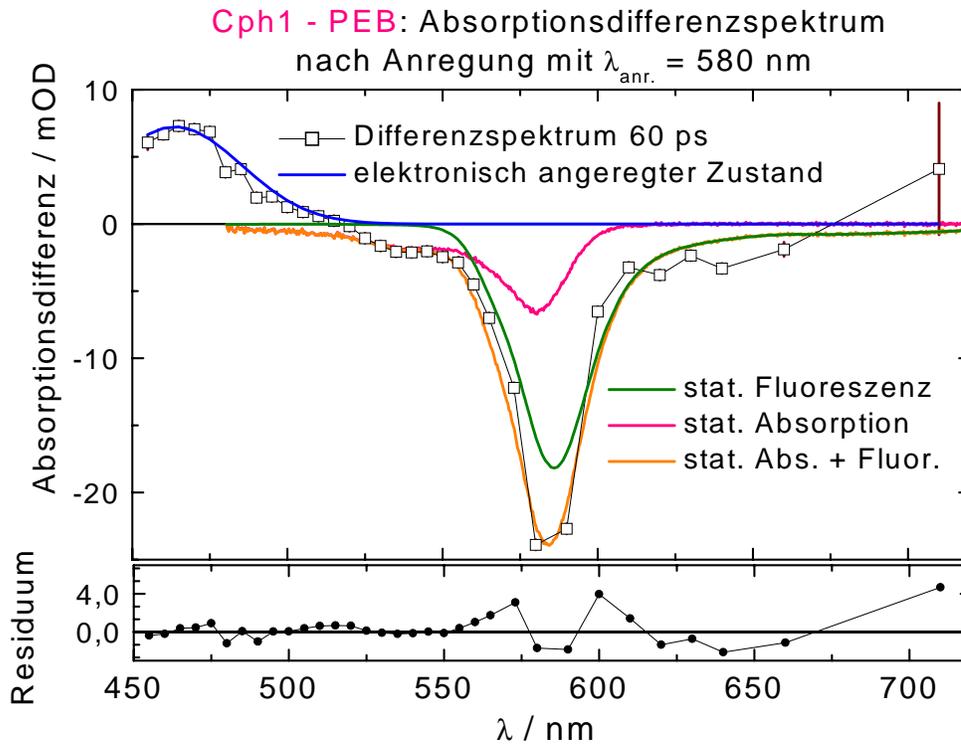


Abbildung 3.8: Gezeigt ist das Differenzspektrum (schwarze offene Quadrate) von Cph1-PEB, wie es sich aus den gemessenen Kinetiken nach 60 ps ergibt. Die Standardabweichungen der einzelnen Datenpunkte sind als Striche durch die Quadrate angegeben. Weiterhin sind die statische Absorption (rosa Linie), die statische (ν^3 -korrigierte) Fluoreszenz (grüne Linie), die Summe von beiden (orange Linie) und die simulierte Absorption des angeregten Zustandes (blaue Linie) dargestellt. Die untere Grafik zeigt die Differenz zwischen Differenzspektrum und der Summe aus statischer Absorption, Fluoreszenz und Absorption des angeregten Zustandes.

mentellen Differenzspektrums von 525 nm bis 720 nm im Rahmen des Fehlers gut wiedergegeben. Im Spektralbereich unter 520 nm ist die Absorption positiv und auf die Absorption des elektronisch angeregten Zustandes (ESA) zurückzuführen, die mit derselben Zeitkonstante zerfällt wie die stimulierte Emission. Die blaue Linie stellt einen Gauß-Fit der ESA dar, deren Maximum bei 465 nm liegt und eine spektrale Halbwertsbreite (FWHM) von 50 nm aufweist. Die Summe von ESA, SE und GA geben gut das gesamte Differenzspektrum wieder, was auch direkt am Residuum in Abbildung 3.8 zu sehen ist. Die Abweichungen, die direkt um den Absorptionspeak der GA bei 580 nm zu sehen sind, könnten dadurch verursacht werden, dass unsere Annahme, dass die (ν^3 -korrigierte) stimulierte Emission der stationären Fluoreszenz folgt nur näherungsweise stimmt. Im Bereich der Schulter der GA ist die Übereinstimmung sehr gut und die Messungen liefern keinen Hinweis darauf, dass die Schulter in der GA durch einen spektral

anders absorbierenden elektronischen Grundzustand verursacht wird.

Betrachtet man den frühen Zeitbereich bis 1 ps der Kinetiken in den Abbildungen 3.9, so ist erkennbar, dass die elektronische Antwort der Küvette mit Lösungsmittel gut abgezogen werden konnte (siehe dazu Abschnitt 2.6.2 und Abbildung 2.21). Damit ist eine zeitlich genaue Charakterisierung des Signalanstiegs möglich. Der Verlauf der in den Abbildungen 3.9 gezeigten Absorptionssignale folgt der *Systemresponse* um 35 ± 15 fs zeitverzögert. Die Datenpunkte deuten auf einen verzögerten Anstieg hin, wobei allerdings eine Anstiegszeit von etwa 35 ± 15 fs nicht ausgeschlossen werden kann, da die Datenpunkte im Zeitbereich der *Systemresponse* durch die Bereinigung des Signals von der Küvettenantwort einen größeren Fehler aufweisen. Der Zeitnullpunkt wurde durch *Kerrgating*-Messungen bestimmt und mit der Antwort der Küvette samt Lösungsmittel auf den Anregungsimpuls verglichen (siehe Abbildung A.7). Kinetiken die im Maximum der Cph1-PEB Grundzustandsabsorption aufgenommen wurden, weisen einen "Überschwinger" (Übereinstimmung von Anregungs- und Abtastwellenlänge) auf und sind deshalb etwas schwieriger zu interpretieren. Eine solche Kinetik ist in Abbildung 3.9 bei der Abtastwellenlänge von 580 nm zu sehen. Aus der Form und zeitlichen Lage des "Überschwingers" können ebenfalls indirekte Rückschlüsse auf den Zeitnullpunkt gezogen werden. In Abbildung 3.10 ist die Kinetik bei 580 nm in einem kleineren Zeitbereich zusammen mit dem *Kerrgating*signal und der Antwort der Leerküvette zu sehen. Das Maximum der Kinetik liegt bei etwa 23 fs und ist zeitlich gegenüber dem Nullpunkt verschoben, was zuerst einmal die Zeitnullpunktsbestimmung in Frage stellt. Der Effekt der Zeitverzögerung des "Überschwingers" ist aber von Cong et al. [89] sowohl experimentell als auch rechnerisch nachvollzogen worden. Er ist dadurch begründet, dass einerseits der Chromophor eine endliche Relaxationszeit aufweist und andererseits Beiträge durch die Korrelationszeit des Lösungsmittels³ auftreten, wenn sie vergleichbar mit der Lichtimpulsdauer ist. Außerdem treten die Beiträge des "Überschwingers", wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, parallel zum *Kerrgating*signal auf, was insgesamt darauf schließen lässt, dass eine Bestimmung des Zeitnullpunktes auf ± 15 fs möglich ist.

Eine zusätzliche Zeitkonstante von etwa 142 ± 106 fs mit kleiner Amplitude (etwa 5%) deutet sich in den Kinetiken bei 610 nm, 620 nm, 630 nm und 640 nm an, kann aber nicht stabil gefittet werden, da das Rauschen der Datenpunkte um den Zeitnullpunkt dafür zu groß ist.

³einige zehn fs in Lösung bei Zimmertemperatur

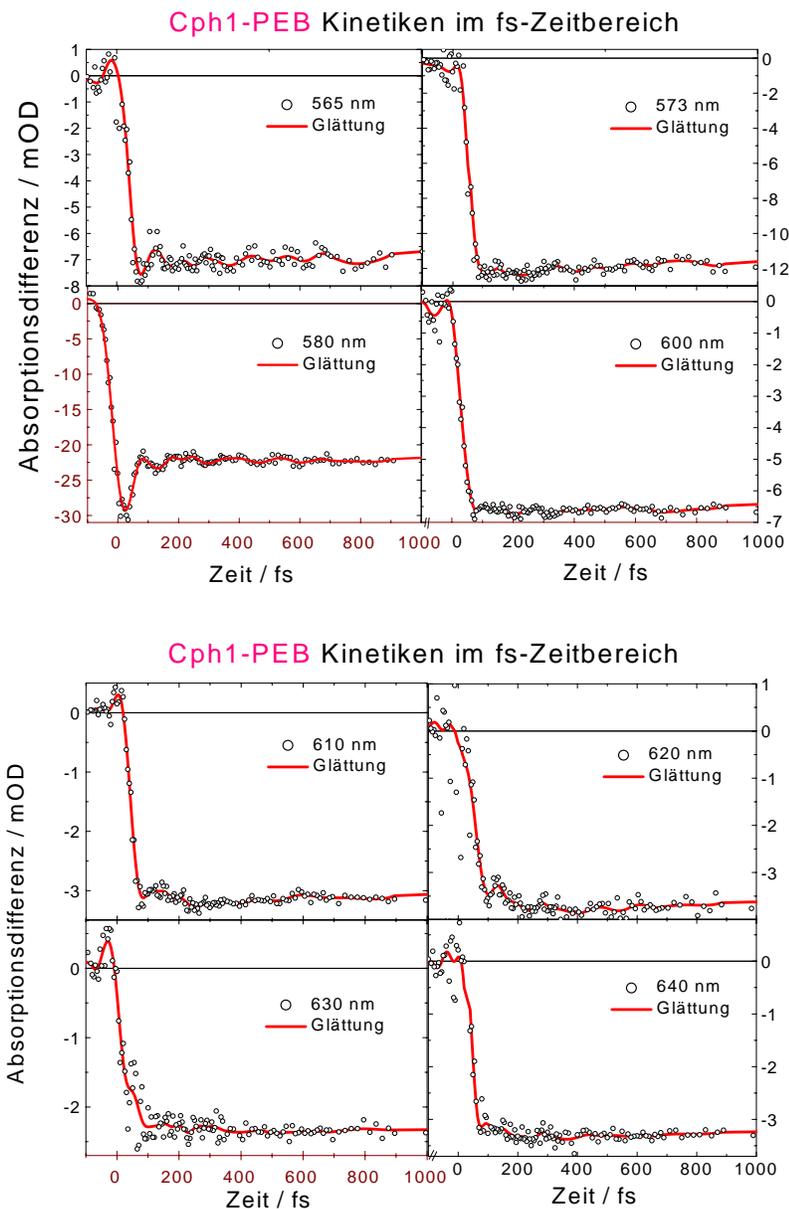


Abbildung 3.9: In vier verschiedenen Grafiken sind Kinetiken von -100 fs bis 1 ps gezeigt. Alle Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 580 nm durchgeführt und die Abtastwellenlängen sind in den Grafiken aufgeführt. Die Datenpunkte der Kinetiken sind als runde offene Kreise dargestellt. Damit der Verlauf der Kinetik besser nachzuvollziehen ist, wurde eine FFT-Glättung der Daten zugefügt (durchgezogene rote Linie).

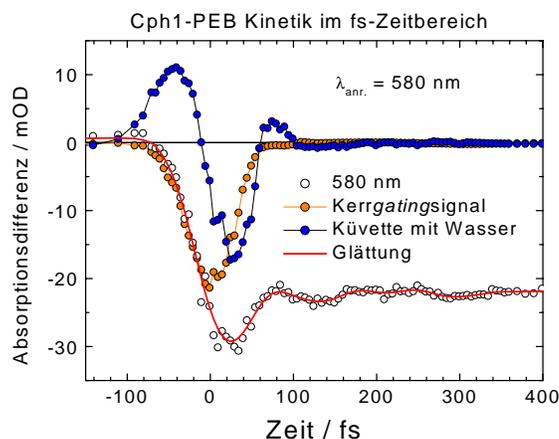


Abbildung 3.10: In dieser Grafik ist der Kurzzeitbereich der Cph1-PEB Kinetik bei 580 nm dargestellt. Anregungs- und Abtastwellenlängen sind identisch. Die Kurve mit den offenen Kreisen stellt die aufgenommenen Datenpunkte von Cph1-PEB dar, in denen schon die Beiträge der Küvette mit Wasser (blaue Kreise) abgezogen wurden. Die orange gefärbten Datenpunkte zeigen das Kerrgatingsignal und die rote Kurve stellt eine FFT-Glättung der Cph1-PEB Datenpunkte dar, die Frequenzen über $\frac{1}{25f_s}$ abschneidet.

Zusätzlich zur verzögerten SE müsste ein instantan auftretender Beitrag der GA zu sehen sein. Dies ist nicht der Fall, was zum einen daran liegen kann, dass die SE einen 2,8 mal größeren Beitrag zum Signal liefert als die GA und zum anderen, dass der frühe Zeitbereich durch die "Bereinigung" des Küvettsignals ein größeres Rauschen aufweist. Die kleinen positiven Absorptionssignale um den Zeitnullpunkt können durch Absorption aus dem angeregten Zustand in höher angeregte Zustände verursacht werden.

Weiterhin sind in den Kinetiken, besonders deutlich in der Kinetik bei 565 nm (in Abbildung 3.9), Ansätze von Beiträgen kohärenter Wellenpaketdynamik⁴ zu sehen. Die FFT-Glättung, die zur Darstellung des groben Verlaufs der Kinetik gezeigt ist, schneidet die hochfrequenten Anteile über $\frac{1}{25f_s}$ bis 500 fs und danach über $\frac{1}{50f_s}$ ab und lässt erahnen, dass das System Oszillationsperioden in der Größenordnung von etwa 100 fs (oder 333 cm^{-1}) aufweist. Berechnet man aus den Fits der Signale die Residuen, so kann man durch Fouriertransformation (FT) der Residuen Aufschluss darüber gewinnen, ob und bei welchen Energien eventuell Vibrationseigenzustände vorliegen. Da die Kinetiken nur Ansätze von Oszillationen zeigen, sind alle Fourierpektren, um die Statistik zu verbessern, addiert worden und die Summe ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Die *System-response* der Messung entspricht einer Wellenzahlaflösung bis etwa 560 cm^{-1}

⁴siehe Anhang Abschnitt A.2.1

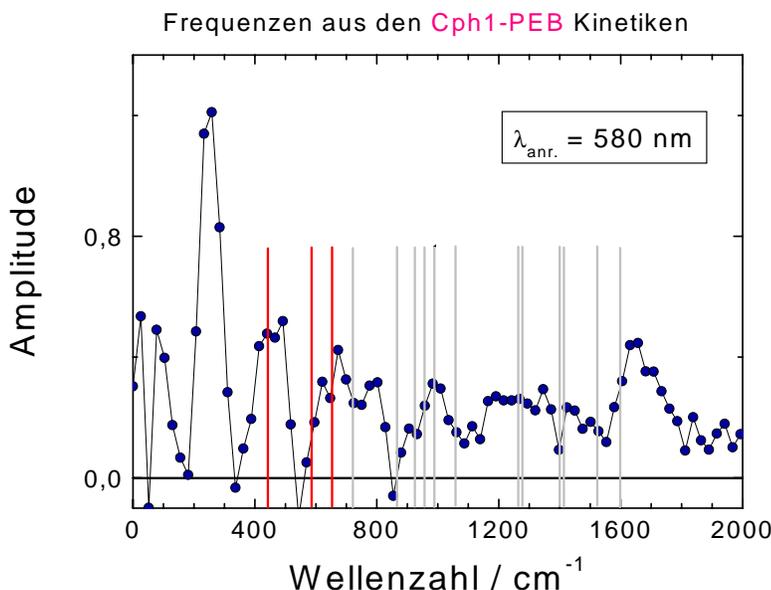


Abbildung 3.11: Summe der Fouriertransformationen der PEB Kinetiken. Die eingezeichneten Balken repräsentieren gemessene Resonanz Ramanbanden in Haferphytochrom mit dem Chromophor PEB [90], wobei Banden, die im Bereich der Zeitauflösung liegen rot codiert sind. Die Wellenzahlen der Resonanz Ramanbanden liegen von links nach rechts bei: 445, 582, 658, 714, 865, 924, 957, 989, 1059, 1262, 1279, 1399, 1413, 1525 und 1597 cm^{-1} . Die in der Kinetik auftretenden Wellenzahlen, die im Bereich der Zeitauflösung liegen sind: 28, 77, 257, 445 und eventuell 670 cm^{-1} .

und höherenergetische Wellenzahlen sollten nur zu sehen sein, falls ihre Amplituden groß sind. Aus dem FT-Spektrum ergeben sich fünf Banden bei: 28, 77, 257, 445 und 670 cm^{-1} . Zum Vergleich sind die Lage der Banden aus einem Resonanz-Raman (RR) Spektrum von Haferphytochrom mit Chromophor PEB aus [90] aufgetragen. Die Bande bei 445 cm^{-1} ist auch in den RR-Spektren zu sehen und wird dort hauptsächlich der Vinyl-Gruppe des PEB's zugeordnet⁵ und die Bande um 670 cm^{-1} wird durch Torsion um die C=C Doppel- und C-C Einfachbindung und Verdrillung der Tetrapyrrolringe in der Ringebene erzeugt. Die anderen drei Wellenzahlen können nicht zugeordnet werden, da nur RR-Daten ab 400 cm^{-1} vorliegen. Auch bei höheren Wellenzahlen scheinen einige Banden überein zu stimmen, aber die Signifikanz ist gering. Es ist zu erkennen, dass in Cph1-PEB eine kohärente Wellenpaketdynamik vorliegt, die allerdings noch der genaueren Charakterisierung bedarf.

Die Reaktionsdynamik von Cph1-PEB weist - ohne die Möglichkeit zur Isomerisierung - einen verzögerten Anstieg der SE oder einen schnellen Anstieg von etwa

⁵Die Bande ist in dem RR-Spektrum auch relativ breit

35 fs, eine Zerfallszeit im ns-Bereich und eventuell eine Anstiegszeit von etwa 150 fs im fs-Zeitbereich auf.

Die beobachtete Zerfallszeit im ns-Bereich stimmt mit den Zerfallszeiten⁶ von 0,71 ns, 2,6 ns und 4,5 ns aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen der AG Prof. Heyn [91] an Cph1-PEB überein. Daraus lässt sich schließen, dass Cph1-PEB etwa 500 fs nach der Anregung das Minimum der S_1 -Oberfläche des angeregten Zustandes erreicht hat und von dort durch Fluoreszenz (oder über strahlungslose Übergänge) in den Ausgangszustand zurückkehrt.

Im fs-Zeitbereich ist eine Anstiegszeit der SE von 150 fs mit einer kleinen Amplitude zu sehen. Dies könnte die Relaxation der Proteinumgebung auf die Anregung des Chromophors widerspiegeln. Zusätzlich ist entweder eine Anstiegszeit von etwa 35 fs oder eine verzögerte SE zu beobachten. Die schnelle Anstiegszeit könnte auf Schwingungsrelaxation des Chromophors zurückzuführen sein, wohingegen das verzögerte Auftreten der SE schwerer zu erklären ist, da es ein ballistisches Modell [92] nahelegt. Lochbrunner et al. [92] haben die Ursache für ein verzögertes Auftreten der SE in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole einem Protonentransfer zugeordnet, der etwa 60 fs dauert. Eine ähnliche Erklärung ist hier unwahrscheinlich, da die SE nur um etwa 6 nm gegenüber der GA verschoben ist und eine deutliche Verschiebung bei einem Protonentransfer zu erwarten ist. Da der Chromophor nach der Anregung viel Überschussenergie aufweist, die er nicht schnell abgeben kann, ist anzunehmen, dass sich seine Form ändert (z.B. verbiegt und verdrillt). Anisotropiemessungen geben Hinweise auf ein um etwa 30° geändertes Übergangsdipolmoment und es muß überprüft werden, ob mit Anisotropiemessungen die Ursache für die verzögerte SE gefunden werden kann.

3.2.3 Zusammenfassung von Cph1-PEB

Die Auswertungen der zeitaufgelösten Absorptionsdifferenzmessungen haben folgendes ergeben:

- Die Primärreaktion von Cph1-PEB kann im Zeitbereich bis 400 ps gut durch eine Exponentialfunktion mit der Zerfallszeit von 1100 ps und einem 95%-Vertrauensbereich von 700..2000 ps beschrieben werden.

⁶Bei einem Zeitbereich bis 400 ps macht es keinen Sinn mehrere Zeikonstanten fitten zu wollen, die im ns-Bereich liegen.

- Die Absorption des angeregten Zustandes hat ihr Maximum bei 465 nm und eine spektrale (FWHM)-Breite von etwa 50 nm.
- Die stimulierte Emission tritt mit 35 ± 15 fs verzögert auf.
- Es wurde ein schwacher Amplitudenanteil ($\approx 5\%$) beobachtet, der eine Zeitkonstante von etwa 150 fs aufweist. Als Interpretation bietet sich hierfür Proteinrelaxation als Antwort auf die elektronische Anregung an.
- Es sind erste Hinweise auf eine kohärente Wellenpaketdynamik zu sehen.

3.3 Dynamik der Primärreaktion von Cph1-PCB in der P_r -Form

3.3.1 Einführung

Das Protein Cph1-PCB zeigt die für Phytochrom typische Photochromizität $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$, die durch eine Z,E-Isomerisierung um die $C_{15} = C_{16}$ Doppelbindung des PCB-Chromophors bedingt ist. Zur Untersuchung der Primärreaktion aus der P_r -Form wurde Cph1-PCB sowohl in der Hauptabsorptionsbande um 656 nm als auch in der Schulter bei 615 nm angeregt. Die Variation der Anregungswellenlänge kann zusätzliche Informationen über eine eventuell vorhandene Probenheterogenität und über die Dynamik im angeregten Zustand liefern.

Aus den Cph1-PEB Messungen liegt der Schluss nahe, dass falls eine verzögerte stimulierte Emission oder eine Zeitkonstante um 100 fs beobachtet wird, beide Beobachtungen nicht durch die Isomerisierung verursacht werden. Zerfallszeiten im Zeitbereich unter mehreren hundert Pikosekunden, sind dagegen sehr wahrscheinlich mit der Isomerisierung verknüpft.

3.3.2 Anregung bei 650 nm

3.3.2.1 ps-Zeitbereich

Im folgenden Abschnitt werden Absorptionsdifferenzmessungen im ps-Zeitbereich (ab ≈ 500 fs) nach Anregung von Cph1-PCB P_r in der Hauptabsorptionsbande vorgestellt. Dazu liegen Datensätze vor, die mit dem Weißlicht-Weißlicht (siehe Abschnitt 2.3.1), NOPA-Weißlicht (siehe Abschnitt 2.3.3) und NOPA-NOPA

(siehe Abschnitt 2.3.2) Messaufbau aufgenommen wurden. Da als Grund für verschiedene Messergebnisse in der ps-Reaktionsdynamik an Haferphytochrom in der P_r Form auch Unterschiede in den Messaufbauten wie Zeitauflösung und Anisotropieeffekte diskutiert werden, werden die unterschiedlichen Datensätze einzeln ausgewertet. Die Auswertung erfolgt mittels globalen Fits für verschiedene Fitfunktionen, die sowohl Ratenkonstanten (bzw. Zerfallszeiten) als auch zerfallsassoziierte Spektren (ZAS) liefern. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Datensätze werden kritisch miteinander verglichen, damit die Bevorzugung eines (möglichst einfachen) Fitmodells möglich wird, das den Daten genügt.

Fitmodelle:

Um die an der Reaktionsdynamik beteiligten Ratenkonstanten bzw. Zerfallszeiten zu ermitteln, wäre es wünschenswert, wenn die Ratenkonstanten numerisch durch eine inverse Laplacetransformation der Kinetiken bestimmbar wären. Leider ist die inverse Laplacetransformation numerisch schlecht konditioniert⁷, so dass sie selbst mit zusätzlichen numerischen Verfahren nur eine Näherung der Ratenkonstanten liefert [94]. Wir gehen deshalb anders vor und wählen zwei verschiedene globale Fitmodelle: Das erste Modell mit diskreten Ratenkonstanten geht von einer Summe von Exponentialfunktionen als Fitfunktion aus:

$$\Delta A(\lambda, t) = A_0(\lambda) + \sum_{i=1}^N A_{\tau_i}(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (3.1)$$

Im Zuge der globalen Fitroutine werden die Amplituden $A_{\tau_i}(\lambda)$ und die Zerfallszeiten τ_i bestimmt. Die Amplituden $A_{\tau_i}(\lambda)$ sind den Zerfallszeiten τ_i zugeordnet und werden im folgenden zerfallsassoziierte Spektren (ZAS) genannt. Fittests haben gezeigt, dass für Cph1-PCB der Ansatz wellenlängenunabhängiger Zerfallszeiten gerechtfertigt ist. Das zweite Modell geht von einer kontinuierlichen Verteilung von Ratenkonstanten aus. Dazu wird eine Verteilung $f(k)$ angenommen, die analytisch laplacetransformierbar ist:

$$f(k) = \frac{(n\tau)^n k^{n-1}}{\Gamma(n)} e^{-n\tau k} \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} N(t) &= \mathcal{L}\{f(k)\} \\ N(\lambda, t) &= A_0(\lambda) + A_1(\lambda) \left(1 + \frac{t}{n\tau}\right)^{-n} \end{aligned} \quad (3.3)$$

Die Laplacetransformierte $N(t)$ von $f(k)$ wird als Fitfunktion für die Kinetiken verwendet und die Parameter $A_0(\lambda)$, $A_1(\lambda)$, n und τ werden durch die Fitroutine

⁷Die Kondition gibt die Verstärkung des Fehlers an; siehe dazu [93] S.31ff.

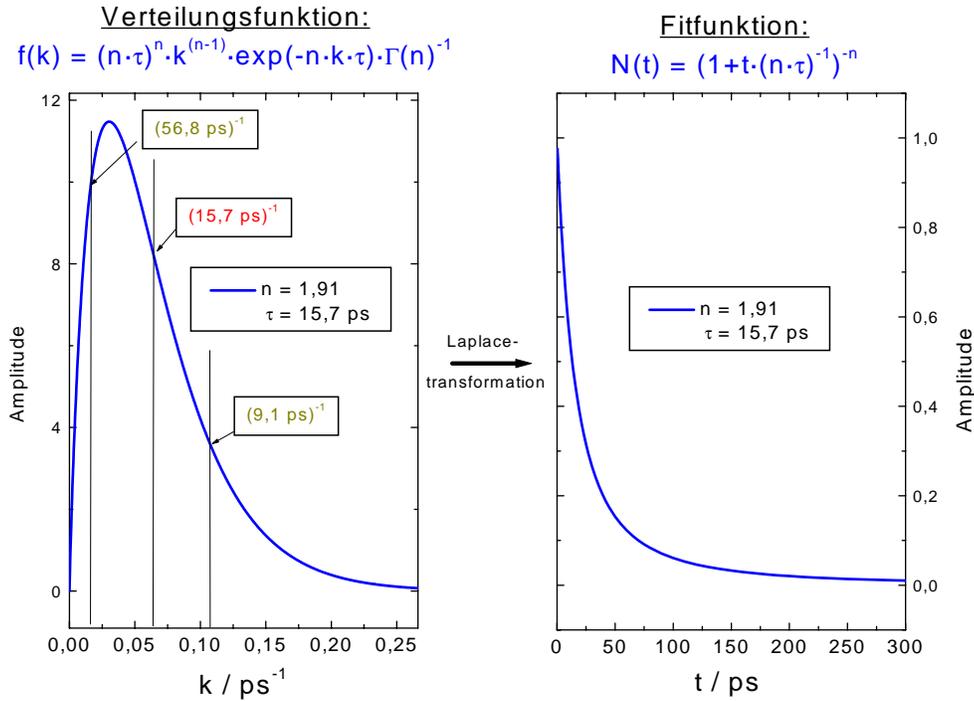


Abbildung 3.12: Auf der linken Seite ist die Verteilungsfunktion von Ratenkonstanten $f(k)$ dargestellt, deren Laplacetransformation $N(t)$ das *power law* (rechts) ist. Der Schwerpunkt von $f(k)$ liegt für Cph1-PCB P_r und 650 nm Anregung bei $k = \frac{1}{\tau} = \frac{1}{15,7 \text{ ps}}$ und $n=1,91$ mit den Standardabweichungen bei $\frac{1}{9,1 \text{ ps}}$ und $\frac{1}{56,8 \text{ ps}}$.

angepasst. Die Amplituden $A_i(\lambda)$ werden wiederum als ZAS und n als Parameter der Verteilung bezeichnet. Der Wert $k_0 = \frac{1}{\tau}$ entspricht dem Schwerpunkt der Verteilung $f(k)$ und τ wird im folgenden - der Einfachheit halber - als Zerfallszeit der Verteilung bezeichnet. Die Form der Verteilung ist in Abbildung 3.12 dargestellt und weist eine asymmetrische Form um den Schwerpunkt (und nur positive Ratenkonstanten) auf. Der Parameter n trägt zur Breite der Verteilung bei und ist antiproportional zur Varianz der Verteilung $f(k)$. Im Zuge der Auswertung werden die Ergebnisse beider Fitmodelle miteinander verglichen und später die unterschiedliche Bedeutung für die Reaktionsdynamik diskutiert.

Weißlicht-*Pump* Weißlicht-*Probe* Aufbau:

Die ersten Ergebnisse, die ich vorstelle, sind Messungen mit dem Weißlicht-*Pump* Weißlicht-*Probe* Aufbau (siehe Abschnitt 2.3.1). Die Anregung von Cph1-PCB P_r fand bei 670 nm statt und die Abtastwellenlänge wurde zwischen 430 und 900 nm variiert. In Abbildung 3.13 ist eine Auswahl von Kinetiken bei sechs

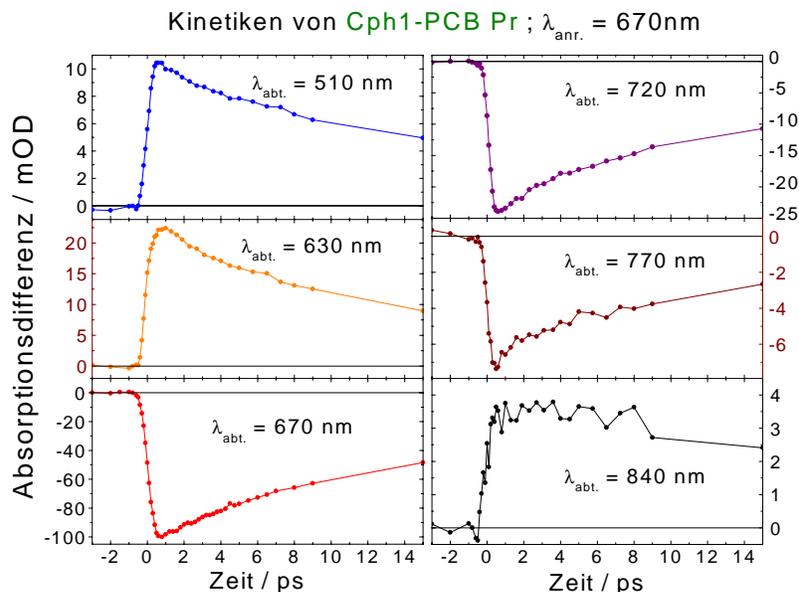


Abbildung 3.13: Eine Auswahl von sechs Kinetiken aus Weißlicht *Pump* / Weißlicht *Probe* Messungen bei verschiedenen Abtastwellenlängen $\lambda_{\text{abt.}}$ sind aufgeführt. Die Anregungswellenlänge beträgt 670 nm, die *Systemresponse* etwa 450 fs.

verschiedenen Abtastwellenlängen gezeigt. Alle gezeigten Kinetiken zeigen auf der ps-Zeitskala instantane, d.h. mit der *Systemresponse* ansteigende Signale, die bei 510 und 630 nm positiv, bei 670, 720 und 770 nm negativ und bei 840 nm wieder positiv sind. Da sich die Grundzustandsabsorption (GA) der P_r -Form (siehe Abbildung 1.6) von etwa 560 bis 690 nm erstreckt, müssen die negativen Signale bei 720 und 770 nm der stimulierten Emission (SE) zuzuordnen sein. Zeitgleich zur SE entstehen die positiven Signale bei 510, 630 und 840 nm, woraus zu schließen ist, dass es sich hierbei um die Absorption des elektronisch angeregten Zustands handelt. Die Kinetik bei 670 nm, die die größte Amplitude aufweist, enthält Beiträge des Ausbleichens der GA und der SE.

Aus den Kinetiken kann man, wie schon in Abschnitt 3.2 besprochen, Absorptionsdifferenzspektren erzeugen, die in Abbildung 3.14 von 1,5 ps bis 300 ps gezeigt sind. Die Amplitude der Absorptionsdifferenzspektren ist über den gesamten dargestellten Wellenlängenbereich für das früheste dargestellte Spektrum (1,5 ps) am größten und wird bis 300 ps stetig kleiner. Im Wellenlängenbereiche von 600 bis etwa 640 nm und im Bereich von 680 bis 720 nm wechseln die Amplituden um 200 ps das Vorzeichen. Das dadurch bei 300 ps zu sehende kleine Absorptionsdifferenzsignal stellt das auf unserer Zeitskala konstante Differenzspektrum zwischen Ausbleichen der GA und Absorption des ersten Photoprodukts dar. Das konstante Differenzsignal ist von etwa 680 bis 720 nm positiv und von 600

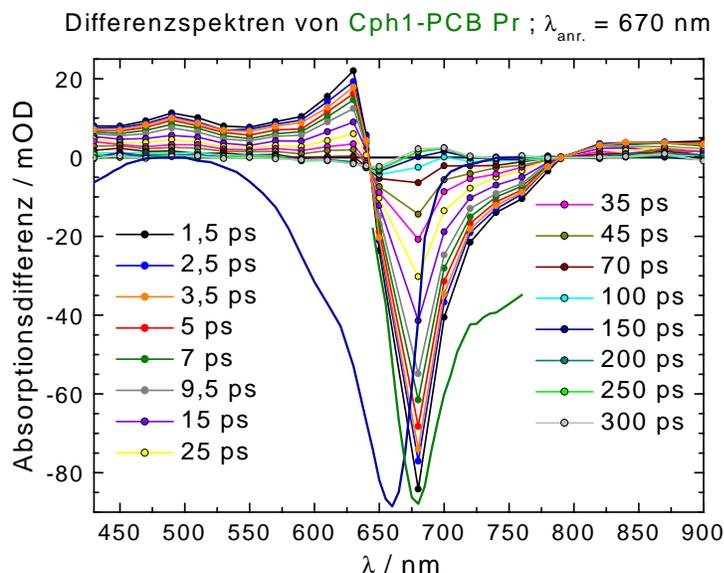


Abbildung 3.14: In dieser Grafik sind die Absorptionsdifferenzspektren aus Weißlicht-Weißlicht Messungen zu verschiedenen Zeiten gegenüber der Abtastwellenlänge aufgetragen. Die Differenzspektren ergeben sich aus den Schnitten der Kinetiken entlang der Abtastwellenlänge zu festen Verzögerungszeiten (siehe Legende). Die blaue durchgezogene Linie stellt zum Vergleich den (negativen) Verlauf der Grundzustandsabsorption und die grüne Linie die korrigierte Fluoreszenz dar. Cph1-PCB P_r wurde bei 670 nm angeregt.

bis ungefähr 670 nm negativ. Betrachtet man wiederum alle Differenzspektren zu verschiedenen Zeiten, so sind zwei isosbestische Punkte bei 643 nm und um 790 nm zu sehen. Zwischen 430 und 640 nm ist ein breiter, flacher Bereich positiver Absorption zu sehen, der zwei Maxima aufweist. Das Maximum bei 490 nm ist auf die sich dort überlagernden ESA und GA (graue Linie in Abbildung 3.14), die dort gerade verschwindet, zurückzuführen, während der Anstieg der positiven Absorption bis 630 nm trotz wachsender GA zunimmt. Zwischen den beiden isosbestischen Punkten ist das Signal (hauptsächlich) negativ und weist ein Maximum um 670 nm auf⁸. Weiterhin zeigt das negative Signal einen ausgeprägten Anteil bei Wellenlängen $\lambda > 690 \text{ nm}$, was auf einen deutlichen Beitrag der SE hindeutet (hell purpurne Linie in Abbildung 3.14). Im Bereich oberhalb 790 nm, dem zweiten isosbestischen Punkt, sind die Beiträge der Absorption wieder positiv. Es liegt aufgrund der Form der positiven Absorptionssignale der Schluss nahe, dass die beiden isosbestischen Punkte durch eine breite ESA, die die positiven Signale erzeugt und der Summe aus GA und SE gebildet werden. Das

⁸Kinetiken bei 670 nm sind nicht bis 300 ps aufgenommen worden und deshalb nicht im Differenzspektrum aufgeführt.

Maximum der ESA liegt dann zwischen 620 und 750 nm. Der Beitrag der SE, der in den Differenzspektren auftritt, ist asymmetrisch und fällt auf der niederenergetischen Seite deutlich langsamer auf Null ab als auf der höherenergetischen Seite. Das könnte so interpretiert werden, dass sich in der SE eine Schulter auf der niederenergetischen Seite befindet, die (eventuell) symmetrisch zur GA ist und durch vibronische Kopplung verursacht wird. Durch die Überlagerung mit der ESA kann dies allerdings in den Differenzspektren nicht eindeutig verifiziert werden. Der Zerfall der Differenzspektren von maximal ≈ 90 mOD bei 1,5 ps auf ein Signal das nach 300 ps nur wenige mOD groß ist, ist deutlich zu erkennen.

Um Fitmodelle auszuschließen sind die Residuen, die Abweichung zwischen Fit und Daten, ein wichtiger Anhaltspunkt. Als Beispiel ist in Abbildung 3.15 eine Kinetik bei 680 nm semilogarithmisch mit verschiedenen Fits aufgetragen. Die Fitfunktionen die verglichen werden, sind Fits mit einer Exponentialfunktion (1 Exp.-Fit), mit zwei und drei Exponentialfunktionen (2 Exp.-Fit und 3 Exp.-Fit) und ein Fit mit einer Verteilung von Ratenkonstanten bzw. Exponentialfunktionen (Verteilungs.-Fit). Die optimalen Werte der globalen Fits⁹ sind:

$$1 \text{ Exp.} - \text{Fit} : \tau_1 = 21,7 \pm 0,3 \text{ ps}$$

$$2 \text{ Exp.} - \text{Fit} : \tau_1 = 6,0 \text{ ps} \quad \tau_2 = 33,5 \text{ ps}$$

$$3 \text{ Exp.} - \text{Fit} : \tau_1 = 4,6 \pm 0,5 \text{ ps} \quad \tau_2 = 24 \pm 2 \text{ ps} \quad \tau_3 = 75 \pm 13 \text{ ps}$$

$$\text{Verteilungs.} - \text{Fit} : \tau = 15,6 \pm 0,3 \text{ ps} \quad n = 1,41 \pm 0,07$$

Die 95%-Vertrauensbereiche des 2 Exp.-Fits sind in Tabelle 3.4 angegeben. Der einzige Fit, der in Abbildung 3.15 deutlich von den Datenpunkten abweicht, ist der 1 Exp.-Fit, was besonders deutlich am Residuum in Abbildung 3.15 zu sehen ist. Zusätzlich zur Güte der Fits ist an der zeitlichen Lage der Datenpunkte zu sehen, dass der frühe Zeitbereich bis 10 ps eine höhere Punktdichte aufweist, wodurch der Fit den frühen Zeitbereich stärker gewichtet als den langen. Dies und besonders die Möglichkeit, dass Anisotropieeffekte die Messergebnisse beeinflussen, muss bei der Diskussion der Fitergebnisse berücksichtigt werden.

Weißlicht-Pump NOPA-Probe Aufbau:

Um Anisotropieeffekte in den Kinetiken auszuschließen, sind die Messungen mit dem NOPA-Weißlicht Aufbau wiederholt worden. Im Gegensatz zum Weißlicht-Weißlicht Aufbau sind nämlich im NOPA-Weißlicht Aufbau die Polarisationsrichtungen des Anregungs- und Abtastlichtimpulses nicht parallel ausgerichtet,

⁹Fehler, die mit \pm aufgeführt sind ergeben sich direkt aus Origin 5.0 MicrocalTM. Falls keine Fehler aufgeführt sind liegen 95%-Vertrauensbereiche aus einer *exhaustive search* Analyse vor, die anderweitig aufgeführt werden.

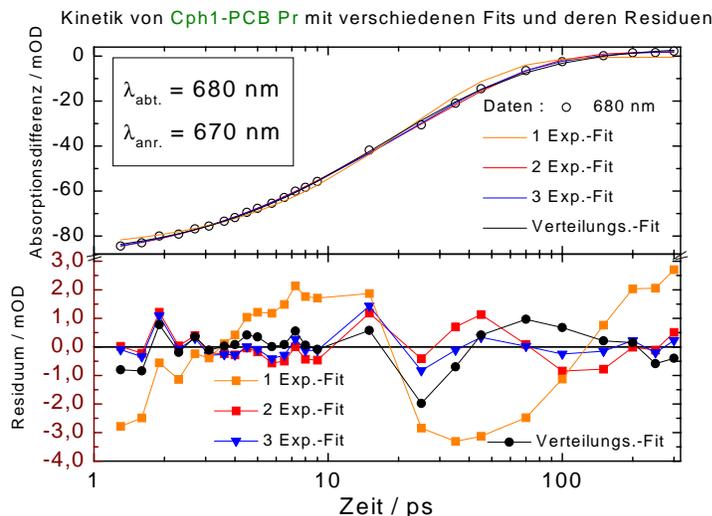


Abbildung 3.15: Vergleich verschiedener Fits von Cph1-PCB P_r bei 680 nm Abtastwellenlänge aus Weißlicht-Weißlicht Messungen (oben). Die Abweichungen der Fits (Residuen) von den Datenpunkten (offene Kreise) sind in der unteren Grafik dargestellt. Als Abszisse ist eine logarithmische Skala gewählt worden, um der Verteilung der Datenpunkte auf der Zeitskala besser gerecht zu werden.

sondern weisen etwa den magischen Winkel $54,7^\circ$ zueinander auf. Kinetiken aus den NOPA-Weißlicht Messungen sind in Abbildung 3.16 aufgeführt. Die Signale sind etwa um den Faktor 6 bis 7 kleiner als in den Weißlicht-Weißlicht Messungen, da die Anregungsenergie um diesen Faktor reduziert wurde¹⁰. Ansonsten sind die Kinetiken sehr ähnlich zu den Kinetiken aus den Weißlicht-Weißlicht Messungen. In Abbildung 3.17 sind die daraus gebildeten Differenzspektren zu sehen. Das Maximum des negativen Signals befindet sich bei 670 nm und die Lage des höherenergetischen isosbestischen Punktes liegt bei 643 nm. Der niederenergetische isosbestische Punkt ist nicht zu sehen, da nur der Wellenlängenbereich von 610..770 nm abgetastet wurde. Im Wellenlängenbereich von $\lambda < 640$ nm sind die Signale positiv und für $\lambda > 640$ nm sind die Signale negativ. Das späteste Differenzspektrum bei 550 ps weist ein geringes positives Signal im Bereich 690..710 nm und ein negatives Signal von 630..680 nm auf. Die Übereinstimmung des spektralen Verlaufs der Differenzspektren, gemessen mit verschiedenen Messaufbauten, ist somit sehr gut. Die Kinetiken wurden nun mit verschiedenen Fitfunktionen ((3.3) und (3.1)) global angepasst und die Residuen jeder einzelnen Abtastwellenlänge sind in den Abbildungen A.8,A.9,A.10 im Anhang aufgeführt.

¹⁰Das ist nötig, da der Anregungsimpuls um diesen Faktor kürzer ist.

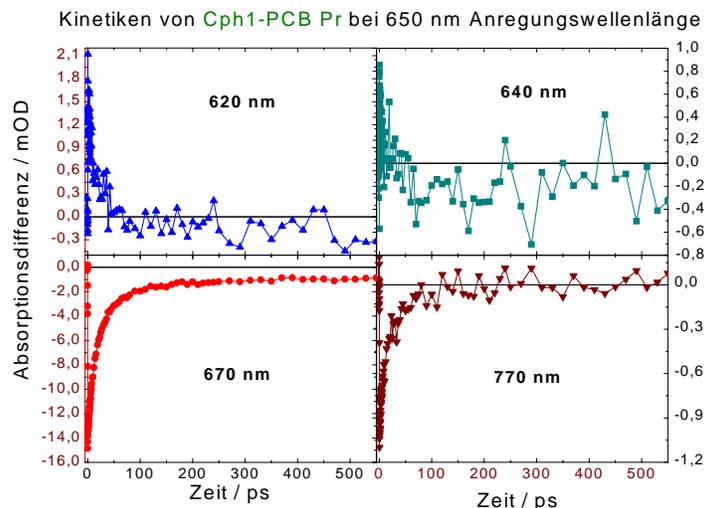


Abbildung 3.16: Vier Kinetiken von Cph1-PCB P_r bei 650 nm Anregung aus NOPA-Weißlicht Messungen sind hier dargestellt. Die Abtastwellenlängen sind in den einzelnen Grafiken zu sehen. Die *Systemresponse* beträgt ≈ 110 fs. Das Signal-Rausch Verhältnis ist bei der Abtastwellenlänge 640 nm überdurchschnittlich groß, da sich hier die ESA und die GA gegenseitig nivellieren.

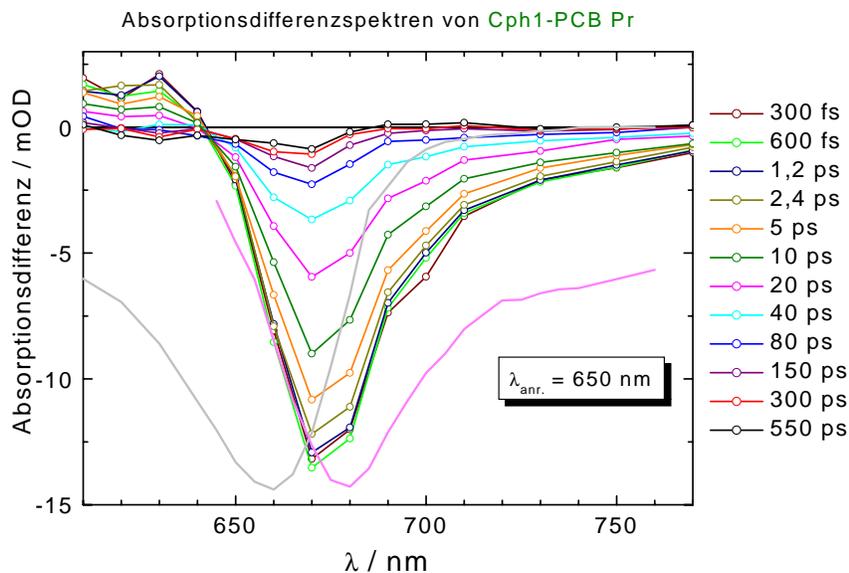


Abbildung 3.17: Differenzspektren von Cph1-PCB P_r bei 650 nm Anregung aus NOPA-Weißlicht Messungen. Die Zeiten zu denen die Schnitte durch die Kinetiken durchgeführt wurden, sind in der Legende aufgeführt. Die graue durchgezogene Linie stellt zum Vergleich den (negativen) Verlauf der Grundzustandsabsorption und die hell purpurne Linie die korrigierte Fluoreszenz dar.

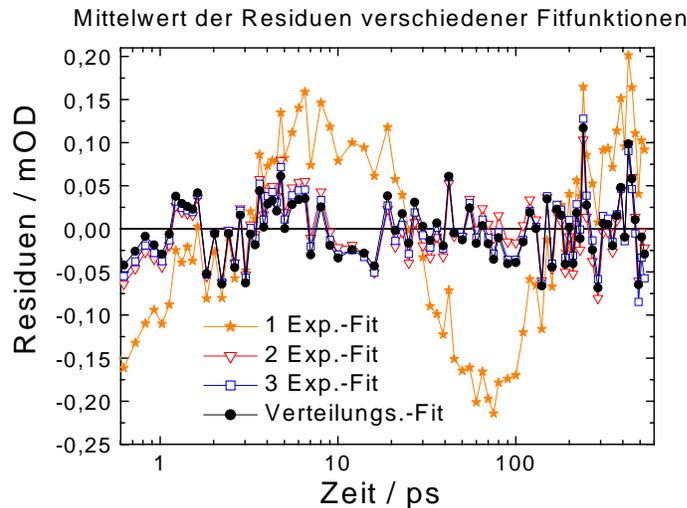


Abbildung 3.18: Mittelwert der Residuen von Cph1-PCB P_r , angeregt bei 650 nm aus NOPA-Weißlicht Messungen für verschiedenen Fitfunktionen. Der Mittelwert wird über alle Abtastwellenlängen gebildet.

Die optimalen Werte der Fits sind

$$1 \text{ Exp. - Fit} : \tau_1 = 22,7 \text{ ps}$$

$$2 \text{ Exp. - Fit} : \tau_1 = 13,6 \text{ ps} \quad \tau_2 = 96,2 \text{ ps}$$

$$3 \text{ Exp. - Fit} : \tau_1 = 11,6 \pm 0,6 \text{ ps} \quad \tau_2 = 42,9 \pm 4 \text{ ps} \quad \tau_3 = 1478 \pm 4478 \text{ ps}$$

$$\text{Verteilungs. - Fit} : \tau = 16,6 \text{ ps} \quad n = 1,71$$

und die 95%-Vertrauensbereiche der Zerfallszeiten sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Nun stellt sich die Frage, welche der Fitfunktionen die Daten am besten beschreibt. Da aus den Einzelresiduen kaum eine systematische Abweichung erkennbar ist, ist der Mittelwert aller Residuen in Abbildung 3.18 für die verschiedenen Fitfunktionen abgebildet. In der semilogarithmischen Auftragung ist die gleichmäßige Verteilung der Messpunkte gut zu erkennen, wodurch eine gleichmäßige Gewichtung des gesamten Zeitbereichs für den Fit gewährleistet ist. Das Residuum des 1 Exp.-Fits in Abbildung 3.18 zeigt deutlich systematische Abweichungen, während die Residuen des 2 Exp.-Fit, des 3 Exp.-Fit und des Verteilungs.-Fits keine oder kaum systematische Abweichungen aufweisen. Die reduzierten χ^2_{MIN} -Werte dieser drei Fits unterscheiden sich nur um etwa 4%, weshalb kein Fit signifikant besser ist. Eine *exhaustive search* Analyse zeigt, dass obwohl ein Fit mit drei Exponentialfunktionen einen Satz von optimalen Zerfallszeiten liefert, die 95%-Vertrauensbereiche der Zerfallszeiten ineinander übergehen, so dass keine 95%-Vertrauensbereiche angegeben werden können. Das legt den Schluss nahe,

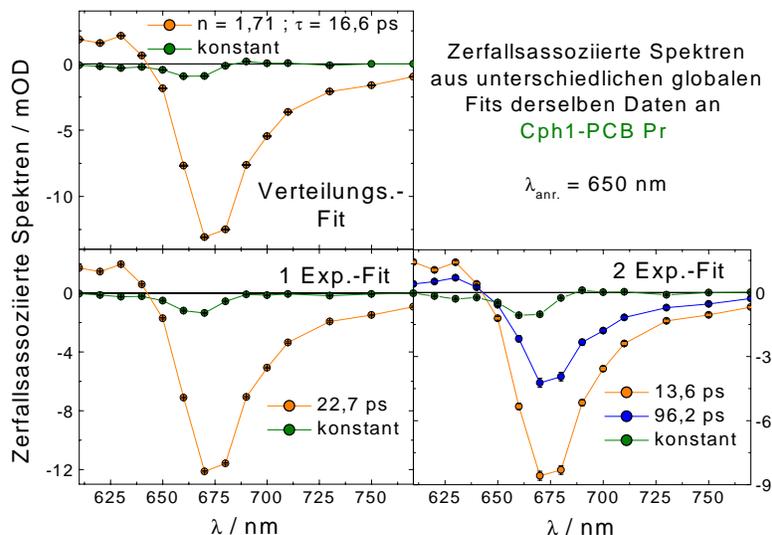


Abbildung 3.19: Zerfallsassozierte Spektren verschiedener Fitfunktionen von Cph1-PCB P_r sind hier dargestellt. In der linken oberen Grafik ist eine Verteilung von Exponentialfunktionen (Exp.'s), in der linken unteren eine Exp. und in der rechten unteren Grafik sind zwei Exp.'s als Fitfunktion angenommen worden. Die Anregung wurde in der Hauptabsorptionsbande von Cph1-PCB P_r bei 650 nm vorgenommen.

dass der Fit mit drei Exponentialfunktionen überbestimmt ist oder die Daten zu verrauscht sind. Einen weiteren Hinweis darauf, wie viele minimale Zerfallszeiten ausreichen bzw. welche Fitfunktion ausreicht, um die Daten zu beschreiben, liefern die zerfallsassozierten Spektren (ZAS). Einerseits sollte das konstante ZAS gut mit den Differenzspektren zu sehr späten Zeiten übereinstimmen (300..550 ps), andererseits könnte, durch eine signifikante spektrale Differenz der ZAS zu verschiedenen Zerfallszeiten, das Modell der Verteilung von Ratenkonstanten widerlegt werden. In Abbildung 3.19 sind zum Vergleich die ZAS der optimalen Fits aus dem Verteilungs-Fit, dem 1 Exp.-Fit und dem 2 Exp.-Fit dargestellt. Darin ist zu sehen, dass sowohl das konstante ZAS des Verteilungs-Fits als auch des 2 Exp.-Fits die Differenzspektren zu späten Zeiten gut wiedergibt. Im Vergleich der Kinetiken mit dem 1 Exp.-Fit ist ersichtlich, dass die Bildung des ersten Photoproduktes (positives Signal um 700 nm) nicht wiedergegeben wird. Als Folge davon weist das konstante ZAS des 1 Exp.-Fits keine positiven Beiträge um 700 nm auf, was in den späten Differenzspektren aber der Fall ist. Auffällig in den ZAS des 2 Exp.-Fits ist, dass sich der spektrale Verlauf beider ZAS nicht unterscheidet. Untersucht man die Abhängigkeit der Amplituden mit der *exhaustive search* Methode, so stellt sich heraus, dass die Werte der Amplituden im

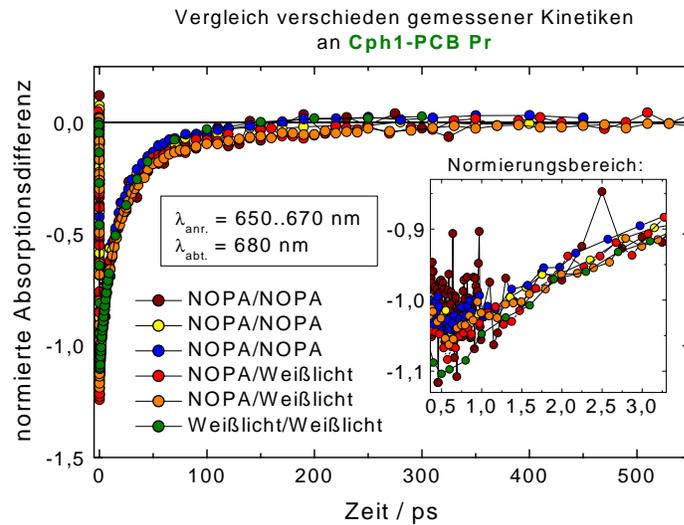


Abbildung 3.20: Hier sind Kinetiken verschiedener Messungen und Messaufbauten zum Vergleich dargestellt. Cph1-PCB P_r wurde bei 650 nm angeregt und bei 680 nm abgetastet. Die Amplituden der Kinetiken wurden im Bereich von 500 fs bis 3 ps auf Eins normiert, was in der eingefügten Grafik rechts zu sehen ist. Die maximale Abweichung beträgt etwa 7%.

95%-Vertrauensbereich ineinander übergehen und sich stark überlappen. Dies ist auch in Abbildung A.11 im Anhang zu sehen, in der zu unterschiedlichen Zerfallszeitpaaren des 2 Exp.-Fits die zugehörigen ZAS dargestellt sind. Man sieht, dass sich die Amplitudenbereiche des unveränderten spektralen Verlaufs der ZAS beinahe vollständig überschneiden, was bedeutet, dass es (mit dem vorliegenden Datensatz) nicht möglich ist, den beiden Zerfallszeiten eindeutig zwei verschiedene, diskrete Zerfallskanäle zuzuordnen¹¹.

Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Messaufbauten:

Um die Statistik der Daten zu verbessern, ziehe ich zur Auswertung noch weitere Datensätze aus NOPA-NOPA Messungen bei 650 nm Anregung hinzu. Im NOPA-NOPA Aufbau sind analog zum NOPA-Weißlicht Aufbau Anisotropieeffekte zu vernachlässigen. Ein Unterschied im Aufbau besteht allerdings darin, dass der Abtastimpuls im NOPA-Weißlicht Aufbau positiv *gechirpt* ist, während er im NOPA-NOPA Aufbau nahezu keinen *Chirp* aufweist. Da der Abtastimpuls nur eine sehr geringe Energie im Vergleich zum Anregungsimpuls aufweist, stört dieser das System kaum, und sollte die Messergebnisse nicht beeinflussen[54]. Vergleicht man alle Kinetiken, die mit den verschiedenen Versuchsaufbauten (Weißlicht-Weißlicht, NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA) und einem Satz von analog prä-

¹¹Simulationsfits an einer Summe von zwei Exponentialfunktionen mit ähnlichen Parametern und Rauschen zeigen, dass auch die Amplituden im 95%-Vertrauensbereich trennbar sind.

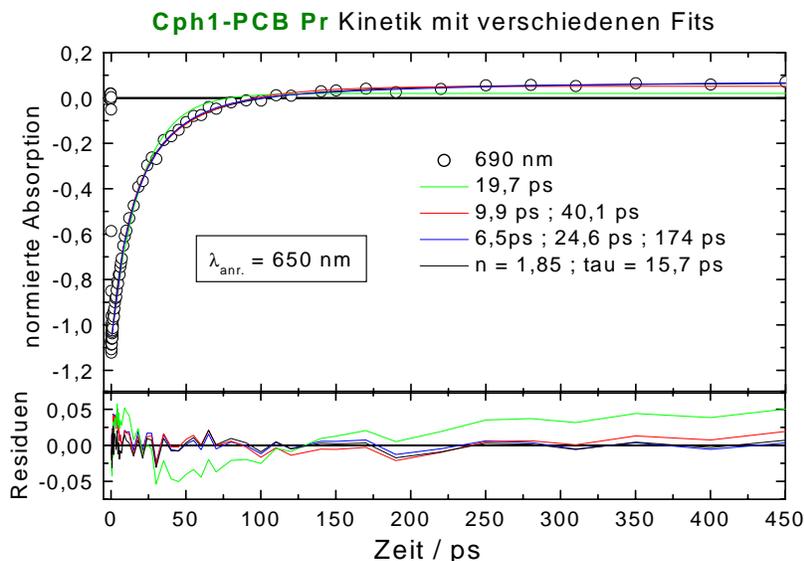


Abbildung 3.21: Hier ist eine Kinetik mit verschiedenen Fits und Residuen dargestellt. Der 1. Exp.-Fit (grün) weicht deutlich von den Datenpunkten (offene Kreise) ab, während Unterschiede zwischen den anderen Fits nur noch in den Residuen sichtbar sind (unten). Cph1-PCB P_r wurde in dieser NOPA-NOPA Messung bei 650 nm angeregt und bei 690 nm abgetastet.

parierten Cph1-PCB Proben aufgenommen wurden, so ergibt sich, dass die Kinetiken alle gut übereinstimmen und eine maximale Abweichung von etwa 7% der Gesamtamplitude aufweisen. In Abbildung 3.20 ist zu jedem Versuchsaufbau mindestens eine Kinetik bei der Abtastwellenlänge 680 nm abgebildet. Um die Kinetiken vergleichbar zu machen, wurden die Amplituden im Bereich von 0,5..3 ps aufeinander normiert. Für die Kinetik aus den Weißlicht-Weißlicht Messungen wurde wegen der längeren *Systemresponse* der Zeitbereich von 1,5 ps bis 3 ps zur Normierung gewählt. Man kann in der Abbildung 3.20 erkennen, dass keine systematischen Abweichungen zwischen den verschiedenen Messaufbauten auftreten. Die Abweichungen der Kinetiken bei anderen Abtastwellenlängen beträgt ebenfalls maximal 7%, so dass es wahrscheinlich erscheint, dass die Abweichungen auf Variationen in den analog präparierten Proben zurückzuführen sind.

Es ist also möglich, die Cph1-PCB-Daten im ps-Zeitbereich aus verschiedenen Messaufbauten, die bei Anregung in der Hauptabsorptionsbande durchgeführt wurden, zu mitteln um die Statistik zu verbessern. Da die Daten aus den Weißlicht-Weißlicht-Messungen Anisotropieeffekte enthalten können und die zeitliche Verteilung der Messpunkte nicht optimal ist, werden nur die Daten aus den NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Messungen gemittelt. Eine Beispielkinetik aus NOPA-NOPA-Messungen ist in Abbildung 3.21 mit Fits und Residuen dargestellt. Die

Fits und Residuen weisen dasselbe Verhalten auf, wie in den NOPA-Weißlicht-Messungen. Der 1 Exp.-Fit weicht deutlich von den Datenpunkten ab, während sich die anderen drei Fits nicht signifikant voneinander unterscheiden. Globale Fits am NOPA-NOPA-Datensatz liefern folgende optimale Werte:

$$1 \text{ Exp.} - \text{Fit} : \tau_1 = 19,4 \text{ ps}$$

$$2 \text{ Exp.} - \text{Fit} : \tau_1 = 10,9 \text{ ps} \quad \tau_2 = 41,5 \text{ ps}$$

$$3 \text{ Exp.} - \text{Fit} : \tau_1 = 5,7 \pm 0,9 \text{ ps} \quad \tau_2 = 18,9 \pm 1,6 \text{ ps} \quad \tau_3 = 72 \pm 9 \text{ ps}$$

$$\text{Verteilungs.} - \text{Fit} : \tau = 15,8 \text{ ps} \quad n = 2,1$$

Die ZAS der Fits stimmen sehr gut mit denen aus den NOPA-Weißlicht-Messungen und den Weißlicht-Weißlicht-Messungen überein und weisen fitunabhängig wiederum nur einen spektralen Verlauf auf. In der Tabelle 3.4 sind die Fitergebnisse mit 95%-Vertrauensbereich und den χ_{MIN}^2 -Werten für alle drei Messungen zum Vergleich aufgeführt. Die globalen Fits mit einer Exponentialfunktion liefern alle übereinstimmend eine Zerfallszeit um 20 ps und die 95%-Vertrauensbereiche erstrecken sich von 17,8 ps bis 25,3 ps. Die χ_{MIN}^2 Werte sind signifikant schlechter als die der anderen Fits. Außerdem ist an den ZAS zu sehen, dass das konstante Differenzspektrum nicht durch das konstante ZAS reproduziert wird (siehe Abbildung 3.19), da kein positiver Beitrag um 700 nm auftritt.

Die globalen Fits mit zwei Exponentialfunktionen weisen alle einen viel besseren χ_{MIN}^2 Wert auf als mit einer Exp.-Funktion. Der optimale Wert der Zerfallszeit τ_1 liegt bei 14 und 11 ps aus den NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Messungen, während die Fits der Weißlicht-Weißlicht Messungen als optimalen Wert 6 ps liefern. Auch die Zerfallszeit τ_2 der Weißlicht-Weißlicht Messungen ist mit 34 ps kürzer als 96 und 42 ps aus den NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Messungen. Analog dazu sind auch die 95%-Vertrauensbereiche der Weißlicht-Weißlicht Messungen gegenüber den anderen beiden Messungen zu kürzeren Zeiten hin verschoben (siehe Tabelle 3.4). Als Grund für die kürzeren Zerfallszeiten könnten Anisotropieeffekte oder die ungleichmäßige Verteilung der Datenpunkte in Frage kommen. Die ZAS der Fits weisen alle denselben spektralen Verlauf auf, wobei sich nur die relativen Amplituden zwischen A_{τ_1} und A_{τ_2} unterscheiden.

Die globalen Fits mit drei Exponentialfunktionen weisen dagegen zwischen den Weißlicht-Weißlicht und NOPA-NOPA Messungen gute Übereinstimmung auf: $\tau_1 \approx 5$ ps, $\tau_2 \approx 21$ ps und $\tau_3 \approx 73$ ps. Der 3 Exp.-Fit der NOPA-Weißlicht Messung liefert dagegen zwei Zerfallszeiten, die im Vertrauensbereich der beiden Zerfallszeiten des 2 Exp.-Fits liegen und eine dritte Zerfallszeit τ_3 die so lang ist, das

<i>Pump-Probe</i>	Fitfunktion	χ_{MIN}^2	optimale Werte	95% - Bereiche
Weißlicht - Weißlicht	1 Exp.	$47,00 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 21,7 \pm 0,3 ps$	
	2 Exp.	$9,80 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 6,0 \pm 0,3 ps$ $\tau_2 = 33,5 \pm 0,7 ps$	$\tau_1 = 3,5..9,1 ps$ $\tau_2 = 28,9..45,4 ps$
	3 Exp.	$7,24 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 4,5 \pm 0,5 ps$ $\tau_2 = 24 \pm 2 ps$ $\tau_3 = 75 \pm 13 ps$	
NOPA - Weißlicht	1 Exp.	$3,60 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 22,7 ps$	$\tau_1 = 20,3..25,3 ps$
	2 Exp.	$1,69 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 13,6 ps$ $\tau_2 = 96,2 ps$	$\tau_1 = 8,4..17,9 ps$ $\tau_2 = 37,2..171 ps$
	3 Exp.	$1,63 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 11,6 \pm 0,6 ps$ $\tau_2 = 42,9 \pm 4 ps$ $\tau_3 = 1500 \pm 4500 ps$	
	Verteilung	$1,66 \cdot 10^{-8}$	$\tau = 16,6 ps$ n=1,71	$\tau = 14,4..19,1 ps$ n=1,2..2,8
NOPA - NOPA	1 Exp.	$32,48 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 19,4 ps$	$\tau_1 = 17,8..21,1 ps$
	2 Exp.	$7,96 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 10,9 ps$ $\tau_2 = 41,5 ps$	$\tau_1 = 7,8..13,9 ps$ $\tau_2 = 31..70 ps$
	3 Exp.	$7,03 \cdot 10^{-8}$	$\tau_1 = 5,7 \pm 0,9 ps$ $\tau_2 = 18,9 \pm 1,6 ps$ $\tau_3 = 72 \pm 9 ps$	
	Verteilung	$7,48 \cdot 10^{-8}$	$\tau = 15,8 ps$ n=2,10	$\tau = 14,8..16,9 ps$ n=1,8..2,5

Tabelle 3.4: In der aufgeführten Tabelle sind die Ergebnisse der globalen Fits mit verschiedenen Fitfunktionen und unterschiedlichen Messaufbauten angegeben. Innerhalb eines Messaufbaus sind stets dieselben Daten gefittet worden. Das angegebene χ_{MIN}^2 ist das reduzierte χ^2 ; die optimalen Werte geben den besten Fit an und die 95%-Bereiche wurden mit der *Exhaustive Search* Methode ermittelt. Anregung in der Hauptabsorptionsbande (um 660 nm).

sie auf der gemessenen Zeitskala als konstant angesehen werden kann. Die χ_{MIN}^2 Werte des 3 Exp.-Fits sind für alle Messungen die besten, allerdings kann bei keinem der Fits eine *exhaustive search* Methode angewandt werden, da die Vertrauensbereiche der Zerfallszeiten ineinander übergehen und sich die χ_{min}^2 Werte bei Variation einer Zerfallszeit kaum ändern. Auch hier ist zu beobachten, dass alle (nicht konstanten) ZAS denselben spektralen Verlauf nur mit verschiedenen Amplituden aufweisen. Da weder die Zerfallszeiten noch die Amplituden der spektralen Verläufe eindeutig unterscheidbar sind, liegt der Schluss nahe, dass die Daten mit einem 3 Exp.-Fit überbestimmt sind.

Die globalen Fits mit einer Verteilung der Ratenkonstanten bzw. Zerfallszeiten

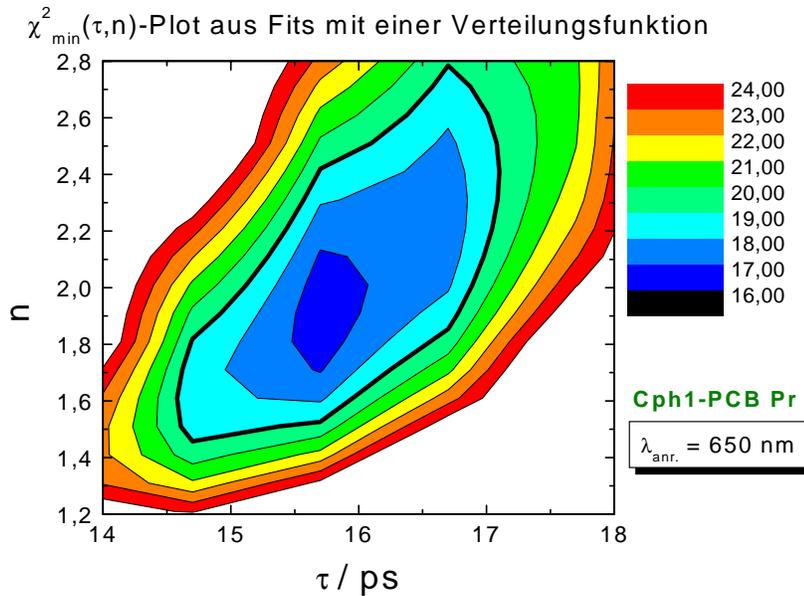


Abbildung 3.22: Aufgeführt ist die χ^2_{min} -Oberfläche, die sich aus der Summe der globalen Verteilungs.-Fits der NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Daten ergibt. Die schwarze dicke Linie grenzt den 95%-Vertrauensbereich von dem übrigen ab. Der Zerfallszeitschwerpunkt τ ergibt sich zu 15,7 ps und der Parameter n zu 1,9. Die Anregungswellenlänge der Cph1-PCB -Probe betrug 650 nm.

ergeben Schwerpunkts-Zerfallzeiten von 16 ps und einen Parameter n von 1,7..2,1 für die NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Messungen. Die globalen Fits der Weißlicht-Weißlicht Messungen sind nur für eine Auswahl von Kinetiken durchgeführt worden, weshalb eine Aufführung in der Tabelle 3.4 entfallen musste¹². Die Schwerpunkts-Zerfallszeit der Kinetiken liegt bei 15,6 ps und n betrug 1,41. Die ZAS der Verteilungsfits geben das konstante Differenzspektrum gut wieder und stimmen mit den spektralen Verläufen der ZAS aus dem 2 Exp.-Fit und 3 Exp.-Fit überein. Die χ^2_{MIN} Werte sind für alle Messungen etwas besser als die der 2 Exp.-Fits und die Schwerpunkt-Zerfallszeiten τ stimmen für alle Verteilungsfits der Messungen miteinander gut überein. Selbst der Parameter n lässt sich für alle Fits der Messungen im Rahmen des 95%-Vertrauensbereichs zur Deckung bringen. Da die Daten fitunabhängig nur einen zeitabhängigen spektralen Verlauf aufweisen, wird die Annahme, dass das System durch eine Verteilung von Ratenkonstanten am besten beschrieben wird, bestärkt. In dem Fall, dass eine Verteilung von Ratenkonstanten vorliegt, sollten die 1 Exp.-, 2 Exp.- und 3 Exp.-Fits Hinweise auf die Verteilung liefern. Der 1 Exp.-Fit sollte eine Zerfallszeit

¹²Das verwendete Programm Origin 5.0 MicrocalTM stürzte beim Fitten selbst definierter Fitfunktionen von mehr als zehn Datensätzen beständig ab.

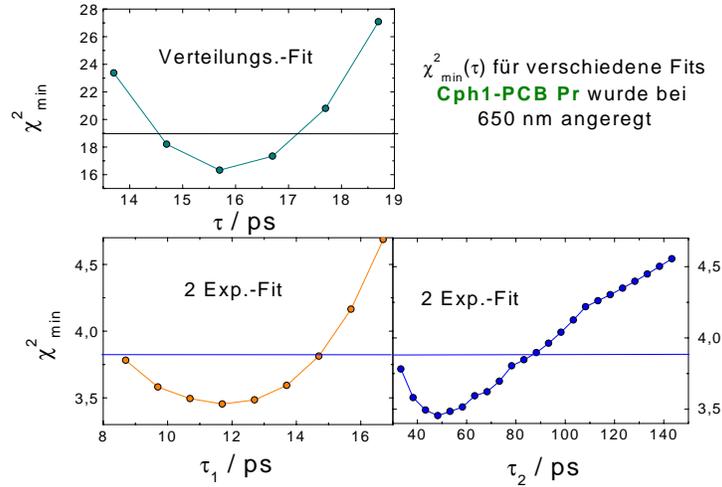


Abbildung 3.23: Exhaustive search Analysen für den Verteilungs-Fit und den 2 Exp.-Fit der gemittelten $\chi^2 - \min$ -Oberfläche. Die obere Grafik zeigt die Abhängigkeit $\chi^2 - \min(\tau)$ für den Verteilungs-Fit und die unteren beiden Grafiken die Abhängigkeiten $\chi^2 - \min(\tau_1)$ und $\chi^2 - \min(\tau_2)$. Die Balken begrenzen den Bereich, in dem sich die Zerfallszeiten zu 95% befinden.

aufweisen, die entweder dem Schwerpunkt oder dem Maximum der Zerfallszeiten entspricht. Die Zerfallszeit $\tau_1 = 20$ ps entspricht gut dem Mittelwert von ≈ 23 ps aus der Schwerpunkt-Zerfallszeit τ und dem Maximum der Verteilung von Zerfallszeiten (Ratenkonstanten) $n\tau$. Die 2 Exp.-Fits und 3 Exp.-Fits sollten unterschiedliche Zerfallszeiten aufweisen, wobei die Zerfallszeit τ_2 des 3 Exp.-Fits etwa dem Mittelwert aus Schwerpunkt-Zerfallszeit und Maximum der Verteilung entsprechen und τ_1 und τ_3 des 3 Exp.-Fits den äußeren Anteilen der Verteilung Rechnung tragen sollte. Außerdem sollte die Zerfallszeit τ_1 des 2 Exp.-Fits zwischen τ_1 und τ_2 des 3 Exp.-Fits liegen und τ_2 des 2 Exp.-Fits zwischen τ_2 und τ_3 des 3 Exp.-Fits. Dies ist tatsächlich für alle Fits, bis auf den 2 Exp.-Fit der NOPA-Weißlicht Messung der Fall, so dass eine Verteilung von Ratenkonstanten aus den Daten am wahrscheinlichsten erscheint. Dennoch sollte, falls die Verteilung von Ratenkonstanten die Dynamik von Cph1-PCB P_r richtig beschreibt, das χ^2_{MIN} des Verteilungs-Fits kleiner oder gleich dem des 3 Exp.-Fits sein. Da dies nicht der Fall ist, liegt der Schluss nahe, dass unsere Verteilungsfunktion $f(k)$ (3.2) nicht exakt mit der Verteilungsfunktion von Ratenkonstanten übereinstimmen kann, die in der Dynamik von Cph1-PCB P_r auftritt. Die Verteilungsfunktion $f(k)$ scheint jedoch eine gute Näherung zu sein.

Mittelwerte der Ergebnisse:

Um die 95%-Vertrauensbereiche genauer angeben zu können, sind für den 2 Exp.-

Fitfunktion	optimale Werte	95% - Bereiche
2 Exp.	$\tau_1 = 11,7 ps$; $\tau_2 = 48 ps$	$\tau_1 = 8,2..14,9 ps$; $\tau_2 = 32..88 ps$
Verteilung	$\tau = 15,7 ps$; $n=1,9$	$\tau = 14,5..17,1 ps$; $n=1,48..2,72$

Tabelle 3.5: Für die Anregung von Cph1-PCB P_r bei 650nm ergeben sich aus den gesamten Daten die hier aufgeführten optimalen Werte und 95%-Bereiche für Fits mit 2 Exponentialfunktionen und Fits mit einer Verteilungsfunktion.

Fit und für den Verteilungs.-Fit die χ_{min}^2 -Oberflächen aus den NOPA-Weißlicht und NOPA-NOPA Messungen zusammengefasst worden. Daraus ergibt sich eine neue χ_{min}^2 -Oberfläche, die für den Verteilungs.-Fit in Abbildung 3.22 und für den 2 Exp.-Fit im Anhang in Abbildung A.12) dargestellt ist. Aus der "gemittelten"¹³ χ_{min}^2 -Oberfläche der Verteilungs.-Fits ergibt sich ein Minimum zu $\tau = 15,7 ps$ und $n=1,9$ mit 95%-Vertrauensbereichen von $\tau=14,5..17,1 ps$ und $n=1,48..2,72$. In Abbildung 3.23 ist die Abhängigkeit von χ_{min}^2 von den Zerfallszeiten dargestellt, aus denen die 95%-Vertrauensbereiche gewonnen werden. Hieran und an den 95%-Bereichen in Abbildung 3.4 ist zu erkennen, dass eine Zerfallszeit um 3 ps nicht signifikant zur Reaktionsdynamik beiträgt. Kleine Beiträge einer Zerfallszeit um 3 ps sind einerseits in der Verteilungsfunktion $f(k)$ enthalten und andererseits könnten diese durch Anisotropieeffekte (Weißlicht-Weißlicht Messungen) verstärkt auftreten. In tabellarischer Form sind die Ergebnisse der "gemittelten" χ_{min}^2 -Oberflächen des Verteilungs.-Fits und des 2 Exp.-Fits in Abbildung 3.5 zusammengefasst.

3.3.2.2 Zusammenfassung ps-Zeitbereich

Die Messungen an Cph1-PCB P_r haben bei einer Anregung in der Hauptabsorptionsbande folgendes ergeben:

- Der Vergleich der Kinetiken, die auf das maximale Amplitudensignal normiert wurden und mit unterschiedlichen Messaufbauten (NOPA-NOPA, NOPA-Weißlicht und Weißlicht-Weißlicht) und analog präparierten Proben aufgenommen wurden, zeigt eine maximale Abweichung von etwa 7% im Absorptionsdifferenzsignal. Da diese Abweichungen auch zwischen Messungen derselben Messaufbauten auftraten, kann geschlossen werden, dass die unterschiedlichen Messaufbauten keinen Einfluss auf die Kinetiken zeigen (Anisotropieeffekte ausgenommen). Man könnte die Abweichungen derart

¹³Die χ_{MIN}^2 Werte werden aufeinander normiert und danach alle χ_{min}^2 Werte addiert.

interpretieren, dass eine Heterogenität des Cph1-PCB P_r -Grundzustands für die Abweichungen verantwortlich ist.

- Die Absorptionsdifferenzspektren zeigen im Wellenlängenbereich von 430..900 nm ein negatives Maximum bei 670 nm mit einer spektralen Halbwertsbreite von 35 nm (FWHM), die während des Zerfalls konstant bleibt und ein positives Maximum bei 630 nm.
- Es sind zwei isosbestische Punkte bei 643 nm und 790 nm in den Differenzspektren beobachtbar.
- Das konstante Differenzspektrum weist einen Nulldurchgang bei 680 nm auf, mit einem positiven Maximum bei 690 nm ($\approx 2,3\%$ vom negativen Gesamtsignal) und einem negativen Maximum bei 670 nm ($\approx 6\%$ vom negativen Gesamtsignal). Die Amplituden der beiden Maxima sind sehr klein, was auf eine starke spektrale Überlagerung der beiden beteiligten Spezies hinweist.
- In dem Bereich der Differenzspektren, in denen die SE dominiert ($\lambda > 690 \text{ nm}$), zeigen die Differenzspektren einen langsamen Abfall, der eventuell auf eine Schulter symmetrisch zur GA zurückzuführen ist.
- Die ESA scheint sich über den gesamten Wellenlängenbereich von 430..900 nm zu erstrecken.
- Die ZAS der 1, 2 oder 3 Exp.-Fits und Verteilungs.-Fits zeigen alle nur zwei verschiedene spektrale Formen: Die Form des konstanten Differenzspektrums und eine weitere, die mit dem Zerfall verknüpft ist.
- Der 1 Exp.-Fit zeigt systematische Abweichungen von den Datenpunkten und reproduziert das konstante Differenzspektrum nicht gut. Aus diesen Gründen muss angenommen werden, dass die Reaktionsdynamik nicht vollständig mit einer Exp.-Funktion beschrieben werden kann.
- Die χ^2_{MIN} Werte der 2 Exp.-Fits, 3 Exp.-Fits und des Verteilungs.-Fits sind deutlich besser als der des 1 Exp.-Fits, aber untereinander nicht signifikant verschieden.
- Für den 3 Exp.-Fit können keine 95%-Vertrauensbereiche bestimmt werden, da die χ^2_{min} -Oberfläche sich mit der Variation einer Zerfallszeit kaum ändert. In einer *exhaustive search* Analyse gehen die Vertrauensbereiche der

Zerfallszeiten (und Amplituden) ineinander über, was dahingehend interpretiert werden kann, dass der Fit überbestimmt ist.

- Die 2 Exp.-Fits liefern Zerfallszeiten von $\tau_1 = 11,7$ ps und $\tau_2 = 48$ ps mit 95%-Vertrauensbereichen: $\tau_1 = 8,2..14,9$ ps und $\tau_2 = 32..88$ ps. Im Gegensatz zu den Zerfallszeiten gehen die Amplituden in der *exhaustive search* Analyse ineinander über, weshalb nicht entschieden werden kann, ob es zwei unterschiedliche, diskrete Zustände gibt.
- Die Verteilungs.-Fits ergeben Schwerpunkt-Zerfallszeiten von $\tau = 15,7$ ps und einen Parameter von $n = 1,9$ mit 95%-Vertrauensbereichen: $\tau = 14,5..17,1$ ps und $n = 1,48..2,72$. Das Gesamtbild der Auswertung deutet auf eine kontinuierliche Verteilung von Ratenkonstanten im Gegensatz zu diskreten Raten hin. Dies wird besonders durch das Auftreten von nur einer zeitlich veränderlichen spektralen Komponente unterstützt. Da die 3 Exp.-Fits aber noch etwas kleinere χ^2_{MIN} Werte aufweisen als der Verteilungs.-Fit, ist zu schließen, dass die Verteilung $f(k)$ nicht die exakte Verteilung von Ratenkonstanten der Reaktionsdynamik wiedergibt. Dennoch stellt die Verteilungsfunktion $f(k)$ eine gute Näherung dar.

3.3.2.3 fs-Zeitbereich

Mit dem NOPA-NOPA und NOPA-Weißlicht Messaufbau ist es möglich die Reaktionsdynamik im fs-Zeitbereich genauer zu untersuchen. Dazu stelle ich kurz Testmessungen mit unterschiedlich *gechirpten* Anregungsimpulsen bei einer Abtastwellenlänge mit dem NOPA-Weißlicht Messaufbau vor und werde danach auf die Messergebnisse aus dem NOPA-NOPA Aufbau mit *ungechirpten* Anregungsimpulsen bei verschiedenen Abtastwellenlängen eingehen.

Um zu überprüfen, ob der *Chirp* des Anregungsimpulses die Dynamik beeinflusst, habe ich im direkten Vergleich hintereinander Messungen mit positiv, negativ und *ungechirpten* Anregungsimpulsen im NOPA-Weißlicht Aufbau durchgeführt. Die Kinetiken zeigen, wie in Abbildung 3.24 zu sehen ist, eine Abhängigkeit des Signals vom *Chirp* des Anregungsimpulses. Die Signale, die mit positiv *gechirpten* Anregungsimpulsen aufgenommen wurden, sind größer als die Signale mit *ungechirpten* und negativ *gechirpten* Anregungsimpulsen. Der Unterschied macht etwa 4% des Signales zwischen positiv und *ungechirpten* und etwa 11% zwischen positiv und negativ *gechirpten* Anregungsimpulsen aus. Diese Beobachtung kann derart interpretiert werden, dass nachdem der Chromophor angeregt wird, auf

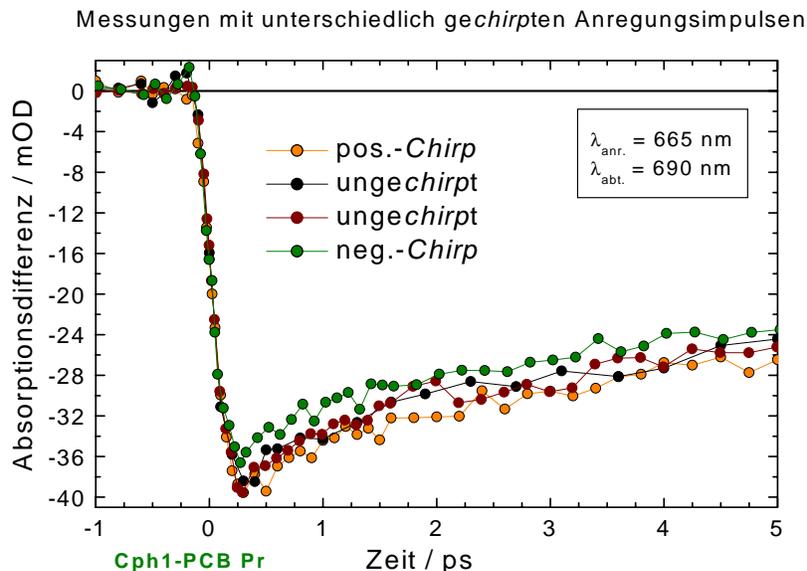


Abbildung 3.24: Die Kinetiken positiv, negativ und nicht *gechirpter* Anregungsimpulse von Cph1-PCB P_r , bei gleichem Abtastimpuls, sind hier dargestellt. Angeregt wurde bei 665 nm und abgetastet bei 690 nm. Die Messungen wurden mit dem NOPA-Weißlicht Aufbau durchgeführt.

der S_1 -Oberfläche (des elektronisch angeregten Zustandes) eine Relaxation stattfindet. Ist der Anregungsimpuls negativ *gechirpt*, werden die niederenergetischen Anteile des Anregungsimpulses, die im Anregungsimpuls hinterher laufen, den relaxierenden Chromophor durch stimulierte Emission deaktivieren. Dadurch werden schon angeregte Chromophore wieder in den Grundzustand überführt und die Folge ist, dass das gemessene Absorptionsdifferenzsignal kleiner wird. Für den Fall des *ungechirpten* Anregungsimpulses ist dieser Effekt verringert, da sich weniger niederenergetische Anteile im später eintreffenden Teil des Anregungsimpulses befinden. Für den Fall des positiv *gechirpten* Anregungsimpulses ist die Deaktivierung minimal. Da die Lichtimpulsdauer des *ungechirpten* Anregungsimpulses in dieser Messung etwa 70 fs betrug, ist zu erwarten, dass die Relaxation mindestens in der Größenordnung von 70 fs liegt. Normiert man die Kinetiken auf die Amplituden in den ersten 0,5 bis 1 ps, so stimmen die Kinetiken im Rahmen des Rauschens bis 550 ps unabhängig vom *Chirp* des Anregungsimpulses vollkommen überein, was nahe legt, dass der *Chirp* des Anregungsimpulses die ps-Reaktionsdynamik nicht oder nur kaum beeinflusst.

Um diese kurze Zerfallszeit etwas genauer zu untersuchen, ist es nötig sich den sub-ps Zeitbereich anzusehen, der für Kinetiken bei 675, 680 und 685 nm in Abbildung 3.25 abgebildet ist. Da der Zeitbereich in der Größenordnung der *Systemre-*

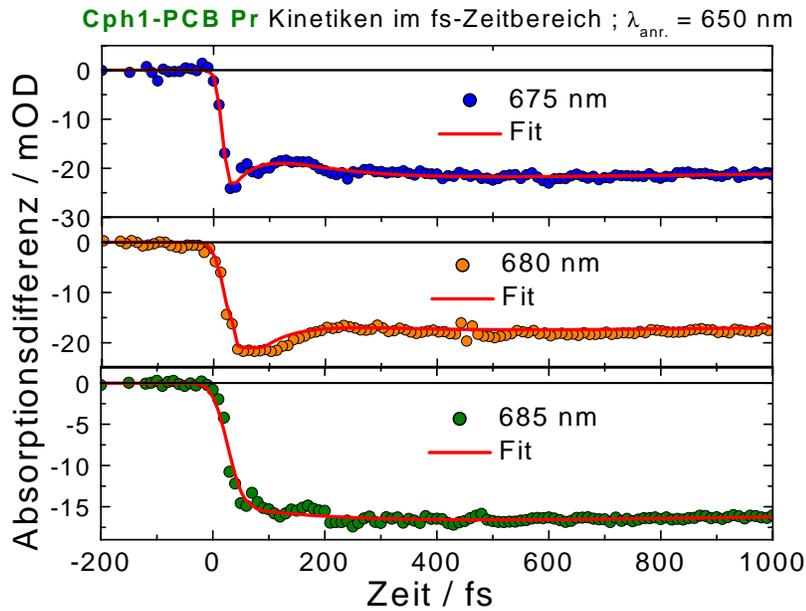


Abbildung 3.25: Eine Auswahl von Kinetiken im fs-Zeitbereich. Die *Systemresponse* betrug etwa 44 fs. Die durchgezogenen Kurven stellen Fits der Daten dar. Die Amplituden der kohärenten Wellenpaketdynamik sind im Vergleich zur Gesamtamplitude sehr klein.

sponse liegt, wird das Programm S2 zum Fitten benutzt, welches eine (vorwärts-) Faltung der *Systemresponse* mit einer Summe von Exponentialfunktionen durchführt. Für die in Abbildung 3.25 dargestellten Kinetiken ergeben sich Anstiegszeiten für einen Teil des negativen Signales von 130 ± 40 fs. Zusätzlich ist für die Kinetiken bei 675 und 680 nm noch eine Zerfallszeit von 56.81 fs zu beobachten, die den Zerfall des nahezu instantan entstehenden Peaks beschreibt. Da diese Zerfallszeit länger ist als die *Systemresponse*, sollte sie der Reaktionsdynamik zuzuschreiben sein. Oszillationen sind in den Kinetiken zu sehen, sie sind jedoch im Vergleich zum Gesamtsignal in Abbildung 3.25 kleiner als in Abbildung 3.26. Die in Abbildung 3.26 vorgestellten Kinetiken mit Fits bei 690, 695 und 720 nm liegen im Spektralbereich, der durch die SE dominiert wird. Die Kinetiken bei 690 und 695 nm weisen einen zum Zeitnullpunkt verzögerten Anstieg des negativen Signals von 42 ± 15 fs bzw. eine Anstiegszeit von etwa 40 fs auf. Zusätzlich tritt eine Zerfallszeit von 180 ± 60 fs für einen kleinen Anteil des negativen Signals auf, der von 690 bis 695 nm abnimmt und bei 720 nm nicht mehr zu fitten ist. In der Kinetik bei 720 nm ergibt sich eine Anstiegszeit des Signals von etwa 85 ± 10 fs. Eine mögliche Erklärung für die auftretenden Zerfallszeiten wäre, dass die Zeitkonstante $\tau_1 \approx 50..80$ fs durch eine Schwingungsrelaxation verursacht wird, in Folge derer die SE zu längeren Wellenlängen hin verschoben wird und mit derselben Zeitkonstante im Wellenlängenbereich $\lambda > 700$ nm ansteigt. Die

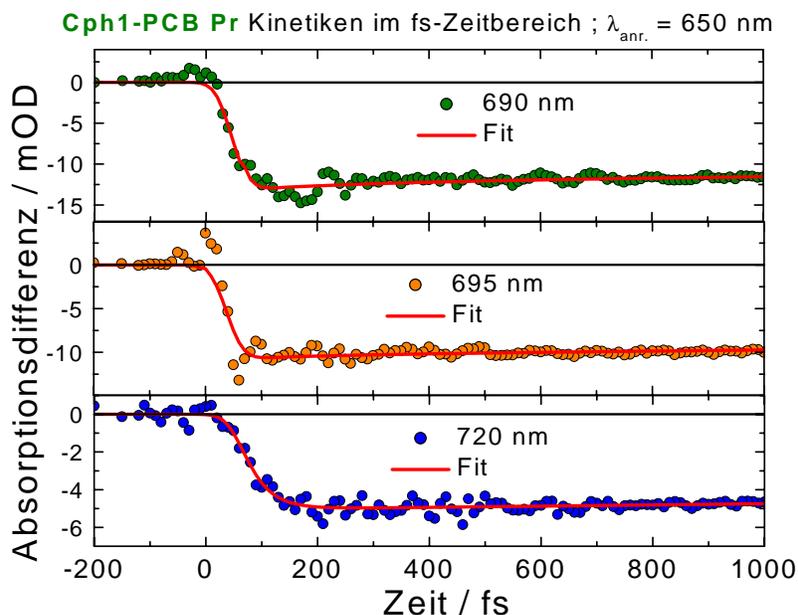


Abbildung 3.26: Eine Auswahl von Kinetiken im fs-Zeitbereich. Die *Systemresponse* betrug etwa 44 fs. Die durchgezogenen Kurven stellen Fits der Daten dar. Die Amplituden der kohärenten Wellenpaketdynamik sind im Vergleich zur Gesamtamplitude sehr klein.

zweite Zeitkonstante $\tau_2 \approx 150 \text{ fs}$ würde eine Relaxation der Proteinumgebung beschreiben, die zu einer Absenkung und leichten Verschiebung der S_1 -Oberfläche führt, so dass das Signal (bedingt durch die SE) um 690 nm leicht abnimmt und dagegen für $\lambda < 690 \text{ nm}$ wieder zunimmt. Zieht man allerdings in Betracht, dass fast im gesamten Spektralbereich die ESA Beiträge zum Signal liefert, so ist keine eindeutige Zuordnung der Zerfallszeiten zu spezifischen Komponenten möglich. Sogar der zeitlich verzögerte Signalanstieg im Bereich der SE könnte durch Überlagerung von ESA und SE erklärt werden, wenn man annimmt, dass durch die Relaxation sich sowohl das Spektrum der ESA als auch das der SE verändert. Dennoch kann aus den Kinetiken geschlossen werden, dass mindestens eine Zeitkonstante von etwa 150 fs auftritt, die durch Mittelwertbildung der Fits zu $150 \pm 50 \text{ fs}$ bestimmt werden kann. Diese Zerfallszeit kann als Schwingungsrelaxation des Chromophors und Relaxation der Proteinumgebung interpretiert werden.

In den Kinetiken der Abbildungen 3.25 und 3.26 sind Oszillationen mit kleiner Amplitude zu beobachten. Führt man eine FT der Residuen z.B. bei der Abtastwellenlänge 690 nm durch, so ergibt sich ein Fourierspektrum, dass die Markerbande der Isomerisierung um 800 cm^{-1} aufweist (siehe in Abbildung A.13 im Anhang). Um das Signal-Rausch Verhältnis zu verbessern, sind die Fourierspektren der verschiedenen Kinetiken (mit hoher Zeitauflösung) addiert worden und

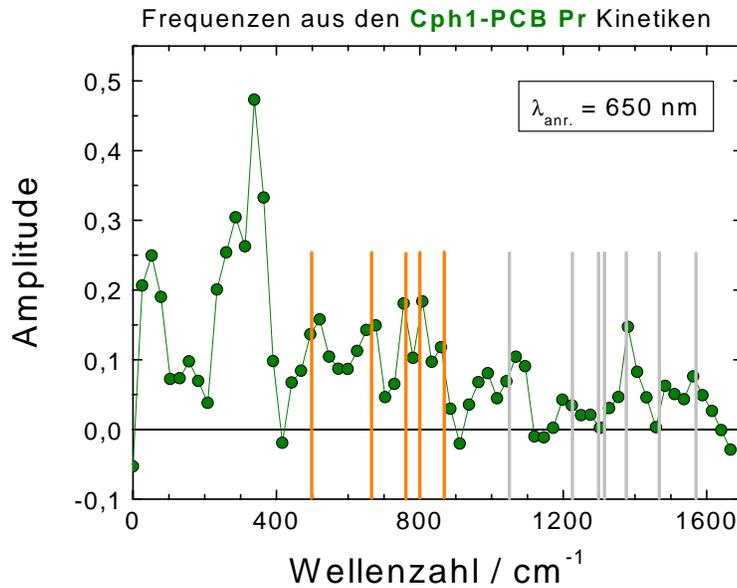


Abbildung 3.27: Summe der Fourierspektren der Residuen der Kinetiken. Die Zeitauflösung entspricht etwa 800 cm^{-1} . Die Banden bei 762 und 800 cm^{-1} sind Markerbanden für die Isomerisierung und werden der C_{15} -HOOP (hydrogen out of plane) Biegeschwingung zugeordnet. Orange Balken liegen im Bereich der Zeitauflösung, die Lage der Balken zeigen Banden aus RR-Messungen an [90].

in Abbildung 3.27 dargestellt. Es ist eine Übereinstimmung einiger Bandenlagen des Fourierspektrums mit den RR-Daten aus [90] bei 493 , 665 , 762 , 801 und 873 cm^{-1} zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den Oszillationsansätzen tatsächlich um kohärente Wellenpaketdynamik im Grundzustand oder im angeregten Zustand handelt. Zu den Banden im Fourierspektrum bei 52 , 150 , 290 und 340 cm^{-1} liegen keine RR-Vergleichsbanden vor. Um unterscheiden zu können, ob die Wellenpaketdynamik auf der S_1 -Oberfläche stattfindet oder nicht, müssen Kinetiken mit ähnlicher Zeitauflösung in einem Abtastwellenlängenbereich durchgeführt werden, in dem nur ESA vorliegt.

3.3.2.4 Zusammenfassung fs-Zeitbereich

- Die Größe des Absorptionsdifferenzsignals ist vom *Chirp* des Anregungsimpulses abhängig, während die Form der Kinetiken davon unbeeinflusst bleibt. Das legt nahe, dass eine Relaxation in der Größenordnung von mindestens 70 fs (Anregungsimpulsdauer) nach der Anregung in den elektronisch angeregten Zustand stattfindet.
- Der sub-ps Zeitbereich weist mindestens eine Zeitkonstante auf, die bei

150 ± 50 fs liegt. Mit dieser Zeitkonstante sind überwiegend Signalanstiege verknüpft. Diese Zeitkonstante könnte der Relaxation auf der S_1 -Oberfläche zugeordnet werden.

- Es ist ein Anstieg der Signale von etwa 40..100 fs in dem Spektralbereich zu beobachten, der von der SE dominiert wird.
- Die Kinetiken weisen Beiträge kohärenter Wellenpaketdynamik auf.

3.3.3 Anregung bei 615 nm

3.3.3.1 ps-Zeitbereich

Da Cph1-PCB P_r ein strukturiertes Grundzustandsabsorptionsspektrum aufweist, stellt sich die Frage, ob bei Anregung in der Schulter des Absorptionsspektrums eine Änderung der Reaktionsdynamik der Primärreaktion zu sehen ist. Dazu werden im Folgenden Daten vorgestellt und ausgewertet, die mit dem NOPA-NOPA Messaufbau aufgenommen wurden. Es werden dieselben Fitfunktionen und Unterscheidungskriterien angewendet, die auch in Abschnitt 3.3.2.1 benutzt wurden, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die in Abbildung 3.28 gezeigten Kinetiken sind alle nach Anregung von Cph1-PCB P_r bei 615 nm aufgenommen worden. Es sind fünf ausgewählte Kinetiken dargestellt, von denen die beiden ersten Kinetiken bei 610 und 620 nm im frühen Zeitbereich einen scharfen negativen Peak, danach eine positive Absorption und nach etwa 50 ps einen konstanten negativen Wert aufweisen. Die anderen drei Kinetiken bei 640, 670 und 695 nm zeigen ebenso den scharfen negativen Peak, danach fällt das Signal aber auf Null ab und bei 695 nm nimmt es nach etwa 200 ps sogar geringe positive Werte an. Bildet man aus dem gesamten Satz von Kinetiken Absorptionsdifferenzspektren, so erhält man die in Abbildung 3.29 aufgeführten spektralen Signalverläufe. Im Wellenlängenbereich von 590 bis 630 nm sind die Signale in den ersten 40 ps überwiegend positiv, während sie von 630 bis 750 nm fast ausschließlich negativ sind. Beide Bereiche werden durch einen isosbestischen Punkt um 633 nm voneinander getrennt. Das Maximum der positiven Absorption liegt bei 620 nm während das Maximum der negativen Absorption um 665 nm liegt und eine spektrale Halbwertsbreite von etwa 50 nm (FWHM) aufweist, die während des Zerfalls konstant bleibt. Das negative Signal dominiert die Differenzspektren im dargestellten Wellenlängenbereich von 590 bis 750 nm.

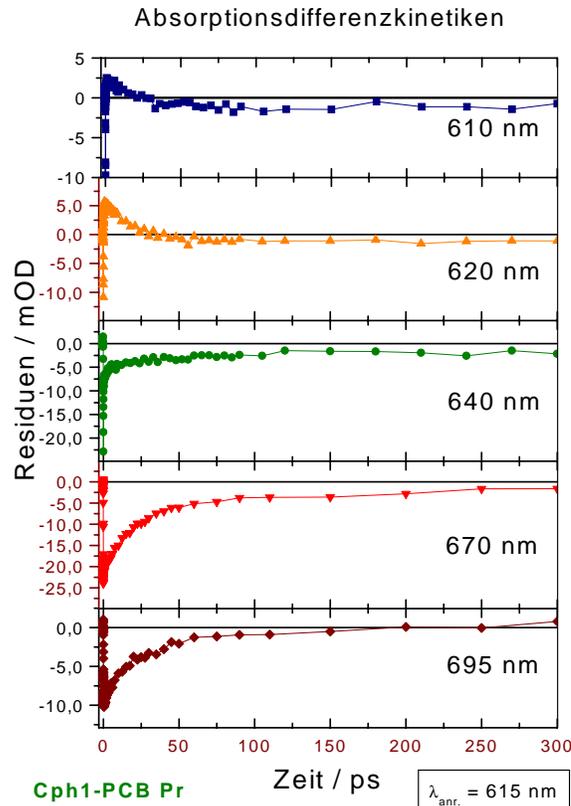


Abbildung 3.28: Fünf zeitabhängige Absorptionsdifferenzsignale von Cph1-PCB bei verschiedenen Abtastwellenlängen sind hier aufgeführt. Die ersten beiden Kinetiken zeigen den Bereich, in dem die Absorption des angeregten Zustandes überwiegt und die anderen Kinetiken den Bereich der Grundzustandsausbleichung und der stimulierten Emission. Die Anregungswellenlänge beträgt 615nm.

Nach 300 ps, also zu späten Zeiten, hat sich ein Differenzspektrum herausgebildet, das von 685 bis 700 nm eine geringe positive Absorption und von 590 bis 680 nm eine negative Absorption zeigt. Die negative Absorption ist etwa -2,2 mOD und die positive 0,77 mOD groß, während das maximale Signal nach einigen hundert fs um 665 nm -20 mOD beträgt. An Hand der grauen Linie in Abbildung 3.29, die den Verlauf der GA zeigt, ist zu sehen, dass die Differenzspektren starke Anteile von SE aufweisen. Ihr Verlauf ist näherungsweise in Abbildung 3.29 als purpurne Linie dargestellt. Die Differenzspektren zeigen einen sehr flachen, plateauartigen Verlauf von 700 bis 730 nm und scheinen sogar von 730 bis 750 nm nochmals anzusteigen, was allerdings auch durch starkes Rauschen in den Kinetiken oberhalb von 730 nm begründet sein kann. Eine Schulter könnte bei 725 nm beobachtbar sein. Die positiven Absorptionssignale im Wellenlängenbe-

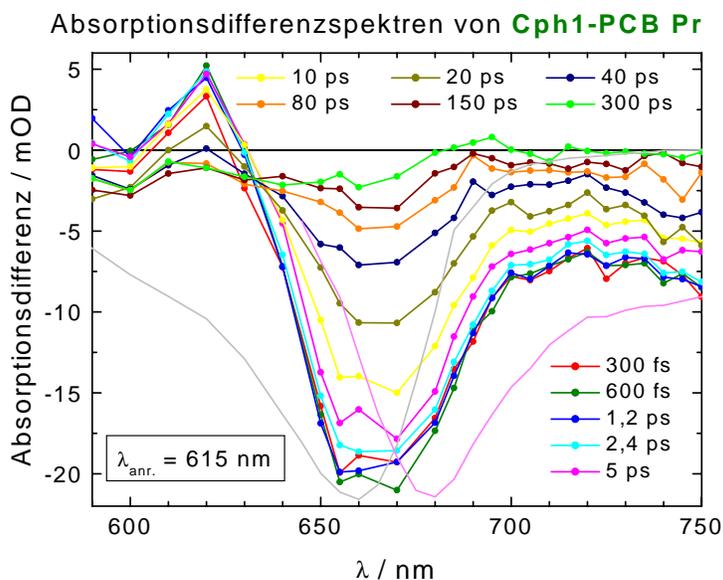


Abbildung 3.29: In der Grafik sind die Absorptionsdifferenzspektren von Cph1-PCB nach Anregung mit 615nm dargestellt. Die Differenzspektren ergeben sich aus den Schnitten durch den Satz von gemessenen Kinetiken zu festen Zeiten (Zeiten siehe Legende). Die graue durchgezogene Linie stellt zum Vergleich den (negativen) Verlauf der Grundzustandsabsorption und die hell purpurne Linie die korrigierte Fluoreszenz dar.

reich $\lambda < 630$ nm sind dem elektronisch angeregten Zustand zuzuordnen, da sie zeitgleich mit der SE auftreten und zerfallen. Dagegen sind die kleinen positiven Signale bei 690 nm und 300 ps höchstwahrscheinlich dem ersten Photoprodukt (elektronischer Grundzustand) zuzuordnen. Die negativen Signale im 300 ps Differenzspektrum (konstantes Differenzspektrum auf unserer Zeitskala) sind dann Folge der Ausbleichung der GA durch die Moleküle, die in die Photoreaktion geschickt werden.

Werden die Kinetiken mit verschiedenen Fits angepasst, so ergeben sich folgende Zerfallszeiten:

$$1 \text{ Exp. - Fit} : \tau_1 = 26,2 \text{ ps}$$

$$2 \text{ Exp. - Fit} : \tau_1 = 15,2 \text{ ps} \quad \tau_2 = 99 \text{ ps}$$

$$3 \text{ Exp. - Fit} : \tau_1 = 4,0 \pm 0,8 \text{ ps} \quad \tau_2 = 17,2 \pm 1,2 \text{ ps} \quad \tau_3 = 99 \pm 12 \text{ ps}$$

$$\text{Verteilungs. - Fit} : \tau = 19,6 \text{ ps} \quad n = 1,3$$

Die 95%-Vertrauensbereiche sind in Abbildung 3.6 aufgeführt und ergeben sich aus einer *exhaustive search* Analyse, deren Ergebnisse in Abbildung 3.32 dargestellt sind. Das wichtigste Kriterium, wie gut die Daten durch die Fits angepasst

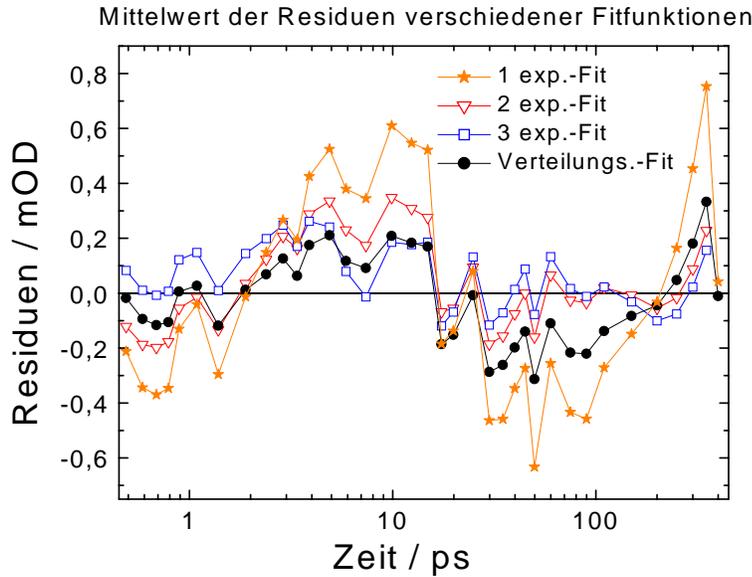


Abbildung 3.30: Hier sind zum Vergleich die Mittelwerte der Residuen verschiedener Fitfunktionen über alle Abtastwellenlängen dargestellt. Die Datenpunkte sind auf der logarithmischen Zeitskala gleich verteilt und zeigen für alle Fits dieselben systematischen Abweichungen mit unterschiedlicher Stärke. Die Anregung von Cph1-PCB P_r fand bei 615nm statt.

werden, ist der Verlauf der Residuen, die für jede Abtastwellenlänge im Anhang in den Abbildungen A.14 bis A.21 zu sehen sind. Da in den einzelnen Residuen nur sehr schwer systematische Abweichungen auszumachen sind, mit Ausnahme der Residuen des 1 Exp.-Fit, sind die Mittelwerte aller Residuen in Abbildung 3.30 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass alle vier Fitfunktionen systematische Abweichungen um 9 und 60 ps aufweisen. Bis etwa 15 ps liefert in Abbildung 3.30 der Verteilungs.-Fit das beste Residuum, während bis 300 ps die 3 und 2 Exp.-Fits bessere Residuen aufweisen. Betrachtet man die Mittelwerte der Residuen über den gesamten Zeitbereich, so weist der 3 Exp.-Fit das beste Residuum auf, gefolgt vom Verteilungs.-Fit und dem 2 Exp.-Fit. Bei den Mittelwerten der χ^2_{MIN} -Werten der einzelnen Residuen ergibt sich eine ähnliche Reihenfolge, wobei der 2 Exp.-Fit allerdings einen geringeren χ^2_{MIN} Wert aufweist als der Verteilungs.-Fit.

Der 1 Exp.-Fit ist in beiden Betrachtungsweisen stets der schlechteste Fit, der signifikant von den anderen Fits abweicht. Betrachtet man die ZAS die sich aus den optimalen Fits ergeben, so kann man in Abbildung 3.31 erkennen, dass das konstante ZAS des 1 Exp.-Fits das späteste (konstante) Differenzspektrum aus Abbildung 3.29 schlecht wiedergibt, da das positive Signal vom ersten Photoprodukt fehlt. Dies ist bei den anderen drei Fitfunktionen nicht der Fall. Das negative Maximum von A_{τ_1} des 1 Exp.-Fit liegt bei 670 nm und das positive Maximum

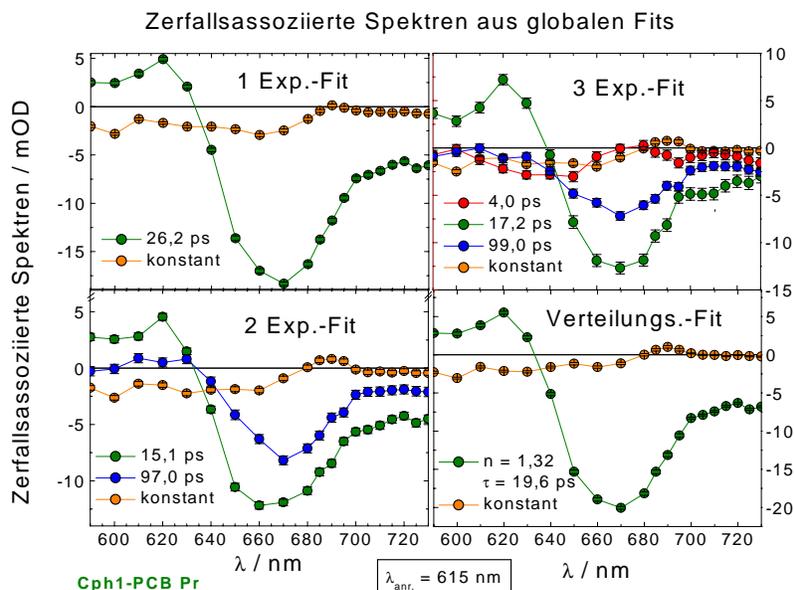


Abbildung 3.31: Alle Grafiken zeigen die zerfallsassozierten Spektren von globalen Fits der Kinetiken, die bei einer Anregung von Cph1-PCB P_r mit 615 nm erhalten wurden. Von links oben nach rechts unten sind die Amplitudenspektren aus Fits mit einer, zwei, drei und einer Verteilung von Exponentialfunktionen dargestellt.

bei 620 nm.

Der 2 Exp.-Fit liefert zwei Zerfallszeiten, deren 95%-Vertrauensbereiche mit einer *exhaustive search* Analyse bestimmt werden können (siehe Abbildung 3.32 und Anhang Abbildung A.23). Die ZAS A_{τ_1} und A_{τ_2} weisen zwei leicht gegeneinander verschobene Maxima auf (660 und 670 nm), wobei die Verschiebung sich im Rahmen des 95%-Vertrauensbereichs ändert. Im Anhang in Abbildung A.22 sind 3 Zerfallszeitpaare mit ihren zugehörigen ZAS dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die relative Verschiebung der Maxima zueinander je nach Zerfallszeit einmal positiv und ein anderes Mal negativ ist, so dass die Verschiebung der Maxima zueinander nicht als signifikant gewertet werden kann. Die Amplitude A_{τ_1} reicht im 95%-Vertrauensbereich von $-2,7.. -17,2$ mOD und die Amplitude A_{τ_2} von $-5,9.. -16,6$ mOD, wobei der optimale Wert bei -12 und $-8,15$ mOD für A_{τ_1} und A_{τ_2} liegt. Die Werte der Amplituden gehen also im Vertrauensbereich ineinander über, so dass auch hieraus nicht auf zwei verschiedene, diskrete Zustände geschlossen werden kann.

Der 3 Exp.-Fit weist das beste χ_{MIN}^2 von allen Fitfunktionen auf. Leider ist eine *exhaustive search* Analyse für die Zerfallszeiten und Amplituden nicht möglich, da die Vertrauensbereiche ineinander übergehen und sich der χ_{min}^2 Wert kaum bei

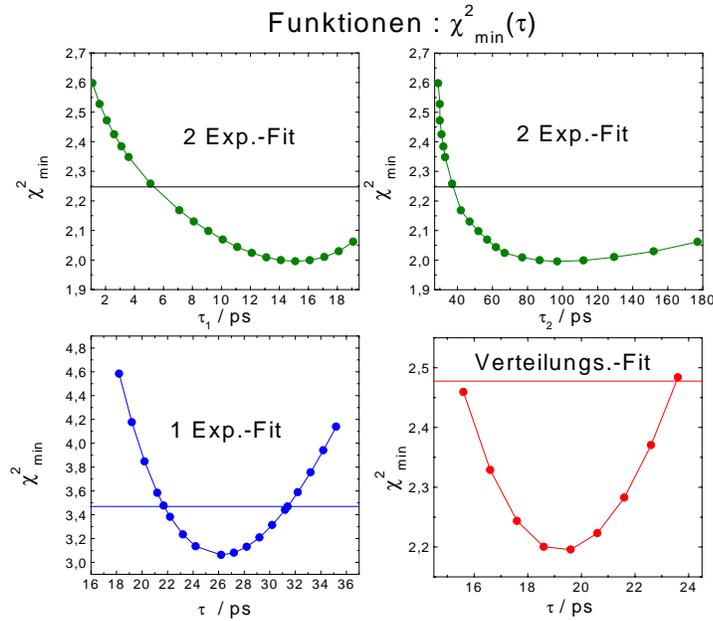


Abbildung 3.32: Minimale (reduzierte) χ^2 -Werte in Abhängigkeit von den Zerfallszeiten für die verschiedenen globalen Fits. In jeder Grafik zeigt der waagerechte Balken an, dass die Wahrscheinlichkeit, dass die Zerfallszeiten oberhalb des Balkens liegen, 5% beträgt. Die oberen beiden Grafiken zeigen die χ^2 -Abhängigkeit von den Zerfallszeiten τ_1 und τ_2 aus einem globalen Fit mit zwei Exponentialfunktionen. Die untere linke Grafik stellt die χ^2 -Abhängigkeit eines globalen Fits mit einer Exponentialfunktion dar und in der unteren rechten Grafik ist die Abhängigkeit $\chi^2(\tau)$ für die Zerfallszeit des Schwerpunktes einer Verteilung von Exponentialfunktionen zu sehen. Der Übersichtlichkeit halber wurde der Faktor 10^{-7} der χ^2_{\min} Werte weggelassen.

Variation der Zerfallszeit oder der Amplitude ändert. Eine Interpretation dafür ist, dass der 3 Exp.-Fit überbestimmt ist und somit keine direkten Schlüsse aus den Fitergebnissen gezogen werden können. Dennoch erscheint die Situation etwas anders als bei der Anregung von Cph1-PCB P_r in der Hauptabsorptionsbande (bei 650 nm), da die Zerfallszeiten τ_2 und τ_3 gut mit den Zerfallszeiten τ_1 und τ_2 aus dem 2 Exp.-Fit übereinstimmen. Wenn man annehmen würde, dass der 3 Exp.-Fit nur wegen zu großen Rauschens überbestimmt erscheint, dann würde die Übereinstimmung der beiden Zerfallszeiten die Annahme unterstützen, dass durch den 3 Exp.-Fit nun eine weitere Zerfallszeit (τ_1) zu den beiden Zerfallszeiten aus dem 2 Exp.-Fit gefunden wurde. Die ZAS der gleich gebliebenen Zerfallszeiten stimmen sogar in etwa überein und nur A_{τ_1} zeigt für den optimalen Fit einen anderen spektralen Verlauf als A_{τ_2} und A_{τ_3} . Die negativen Maxima von A_{τ_2} und A_{τ_3} liegen bei 670 nm und nur A_{τ_2} weist ein positives Maximum bei 620 nm auf. Eine solche Annahme kann nicht ausgeschlossen werden, so lange der χ^2_{\min} Wert des 3 Exp.-Fits noch besser ist als der des Verteilungs.-Fits.

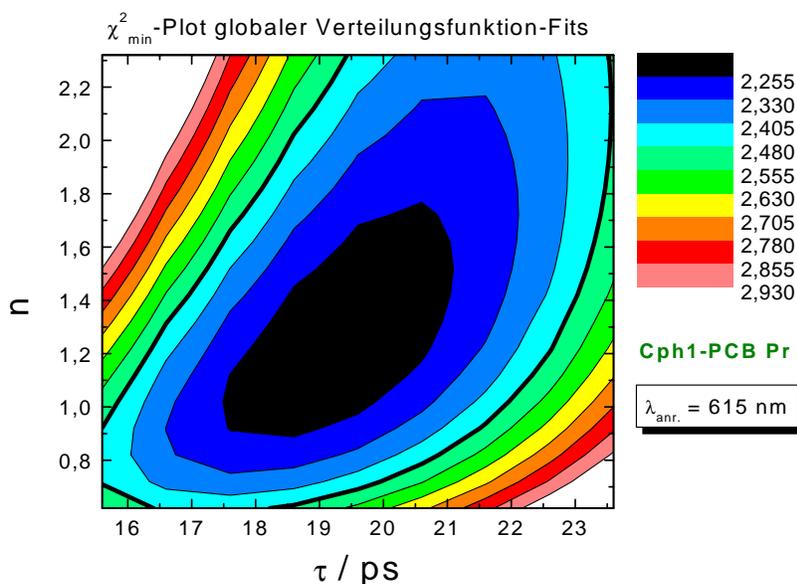


Abbildung 3.33: Hier wird die χ^2 -Fläche eines Fits mit einer Verteilung von Exponentialfunktionen in Abhängigkeit von der Zerfallszeit τ und dem Parameter n gezeigt. Jeder Punkt ist das Ergebnis eines globalen Fits, bei dem τ und der Parameter n fixiert sind, während die Amplituden minimiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass τ und n außerhalb der schwarzen Kurve liegen beträgt 5%.

Der Verteilungs-Fit liefert eine Amplitude A_τ , die ein negatives Maximum des ZAS bei 670 nm und ein positives bei 620 nm besitzt. Die 95%-Vertrauensbereiche sind gut bestimmbar (Abbildung 3.32 und 3.33) und der Mittelwert $\bar{\tau}$ aus Schwerpunkts-Zerfallszeit τ und dem Maximum der Zerfallszeiten $n\tau$ liegt bei ≈ 23 ps. Die Vertrauensbereiche sind allerdings größer als bei Anregung in der Hauptabsorptionsbande, was entweder auf ein größeres Rauschen oder auf eine schlechtere Anpassung der Verteilungsfunktion an die reale Verteilung von Ratenkonstanten zurückzuführen sein könnte. Die χ^2_{\min} -Oberfläche für den Verteilungs-Fit ist in Abbildung 3.33 dargestellt. Die Standardabweichungen der Verteilungsfunktion $f(k)$ liefert Werte für die Zerfallszeiten, die bei $\sigma_1 = 11,2$ ps und $\sigma_2 = 151$ ps liegen. Die Zerfallszeiten aus dem 2 Exp.-Fit liegen beide zwischen der Schwerpunkts-Zerfallszeit und den Standardabweichungen, während die kurze Zerfallszeit τ_1 aus dem 3 Exp.-Fit kürzer als σ_1 und τ_3 ebenfalls kürzer als σ_2 ist. Die Zerfallszeit $\tau_1 = 26,2$ ps aus dem 1 Exp.-Fit liegt nahe dem Mittelwert $\bar{\tau}$. Einen direkten grafischen Vergleich der Verteilungsfunktion mit den Lagen einiger ermittelter Zerfallszeiten ist im Anhang in Abbildung A.31 zu sehen. Aus dem Vergleich der Fits ergibt sich, dass eine Exponentialfunktion nicht ausreicht, um die Reaktionsdynamik zu beschreiben und ein 3 Exp.-Fit das System mit den vorliegenden

Fitfunktion	χ_{MIN}^2	optimale Werte	95% - Bereiche
1 Exp.	$3,06 \cdot 10^{-7}$	$\tau_1 = 26,2 ps$	$\tau_1 = 21,7..31,4 ps$
2 Exp.	$2,00 \cdot 10^{-7}$	$\tau_1 = 15,1 ps$ $\tau_2 = 97 ps$	$\tau_1 = 5,6..22,8 ps$ $\tau_2 = 38,5..582 ps$
3 Exp.	$1,69 \cdot 10^{-7}$	$\tau_1 = 4,0 \pm 0,8 ps$ $\tau_2 = 17,2 \pm 1,2 ps$ $\tau_3 = 99 \pm 12 ps$	
Verteilung	$2,20 \cdot 10^{-7}$	$\tau = 19,6 ps ; n=1,32$	$\tau = 15,4..23,5 ps ; n=0,8..2,0$

Tabelle 3.6: Hier sind in tabellarischer Form die Ergebnisse der globalen Fits mit vier verschiedenen Fitfunktionen dargestellt. Die χ_{MIN}^2 -Werte bezeichnen das reduzierte χ^2 ; die optimalen Werte repräsentieren die Ergebnisse für den besten Fit und die 95%-Bereiche geben das Intervall an, in dem die Werte zu 95% liegen.

Daten überbestimmt. Übrig bleiben noch die Verteilung von Ratenkonstanten und ein Zerfall mit zwei Exponentialfunktionen. Der 2 Exp.-Fit liefert zwei Zerfallszeiten mit demselben spektralen Verlauf, die nicht eindeutig zwei verschiedenen, diskreten Zuständen zugeordnet werden können. Der 2 Exp.-Fit hat ein geringeres χ_{MIN}^2 als der Verteilungsfitt, der ebenfalls einen spektralen Verlauf aufweist, der den Zerfall charakterisiert und im Rahmen des Fehlers mit den meisten anderen (nicht konstanten) ZAS aus den übrigen Fits übereinstimmt. Die Residuen zeigen für alle Fits systematische Abweichungen, so dass keiner der vorliegenden Fits die Reaktionsdynamik exakt beschreiben kann. Wenn man alles in Betracht zieht, wird den Daten die Anpassung des Verteilungs.-Fits am ehesten gerecht.

3.3.3.2 Zusammenfassung ps-Zeitbereich

Die Absorptionsdifferenzmessungen an Cph1-PCB P_r , angeregt in der Grundzustandsabsorptionsschulter bei 615 nm, ergeben:

- Die Absorptionsdifferenzspektren von 590..750 nm zeigen ein negatives Maximum um 665 nm mit einer zeitlich konstanten spektralen Halbwertsbreite (FWHM) von 50 nm und ein positives Maximum bei 620 nm.
- Ein isosbestischer Punkt ist bei 633 nm beobachtbar.
- Das konstante Differenzspektrum (300 ps) nimmt sein positives Maximum bei 695 nm und sein negatives Maximum bei 660 nm an. Im Bezug auf das maximale negative Signal nach einigen hundert fs betragen die Werte des positiven und negativen Maximums etwa 4% und 11%. Der Nulldurchgang des konstanten Differenzspektrums liegt bei 680 nm.

- Alle ZAS der Fits, die mit einer Zerfallszeit um 20 ps assoziiert sind, zeigen die gleichen spektralen Verläufe.
- Der 1 Exp.-Fit zeigt starke systematische Abweichungen von den Daten, reproduziert das konstante Differenzspektrum nur schlecht und weist einen signifikant schlechteren χ^2_{MIN} Wert auf als die anderen Fits. Deshalb liegt der Schluss nahe, dass eine Ratenkonstante nicht ausreicht, um die Reaktionsdynamik zu beschreiben.
- Die χ^2_{min} Werte der 2 Exp., 3 Exp. und des Verteilungs.-Fits sind signifikant besser als der des 1 Exp.-Fits. Die Residuen weisen aber dennoch alle systematische Abweichungen von den Datenpunkten auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Fits ist nicht erkennbar.
- Eine *exhaustive search* Analyse des 3 Exp.-Fits zeigt, dass sowohl die Zerfallszeiten als auch die Amplituden nicht gegeneinander abgrenzbar sind, da die 95%-Vertrauensbereiche ineinander übergehen. Das bedeutet, dass der 3 Exp.-Fit für den aufgenommenen Datensatz überbestimmt ist.
- Der 2 Exp.-Fit liefert Zerfallszeiten von $\tau_1 = 15,1$ ps und $\tau_2 = 97$ ps mit 95%-Vertrauensbereichen von $\tau_1 = 5,6..22,8$ ps und $\tau_2 = 38,5..582$ ps. Die 95%-Vertrauensbereiche der Amplituden sind $A_{\tau_1} = -2,7..-17,2$ mOD und $A_{\tau_2} = -5,9..-16,6$ mOD bei optimalen Werten von $A_{\tau_1} = -12$ mOD und $A_{\tau_2} = -8,15$ mOD. In den Vertrauensbereichen der Amplituden, die sich stark überlappen, sind keine signifikanten spektralen Unterschiede zwischen den ZAS von A_{τ_1} und A_{τ_2} zu erkennen. Die Ergebnisse reichen nicht aus, um auf zwei unterschiedliche Zustände zu schließen.
- Der Verteilungs.-Fit ergibt $\tau = 19,6$ ps und $n=1,32$ mit den 95%-Vertrauensbereichen $\tau = 15,4..23,5$ ps und $n=0,6..2,8$. Die ZAS geben sowohl das konstante Differenzspektrum als auch den spektralen Verlauf der zerfallenden Komponente(n) gut wieder.

3.3.3.3 fs-Zeitbereich

Die Reaktionsdynamik im sub-ps Zeitbereich weist bei Anregung in der Hauptabsorptionsbande (um 650 nm) mindestens eine Zeitkonstante von etwa 150 fs auf und liefert Hinweise darauf, dass die Dynamik eventuell besser mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden würde. Die höherenergetische Anregung von Cph1-

PCB P_r bei 615 nm zeigt ähnliches Verhalten, wie im Folgenden an Hand von NOPA-NOPA Messungen gezeigt wird.

In Abbildung 3.34 ist eine Auswahl von Cph1-PCB P_r Kinetiken mit Fits im Zeitbereich von 200 bis 1000 fs gezeigt. Im Bereich des Bleichsignals, also in den Kinetiken 610, 640 und 670 nm, ist ein nahezu instantan auftretendes negati-

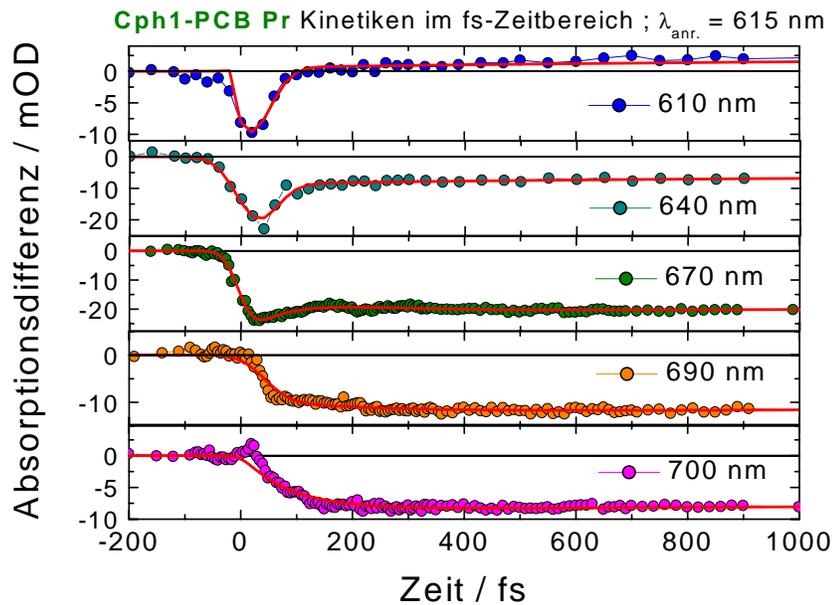


Abbildung 3.34: Eine Auswahl von Kinetiken im fs-Zeitbereich. Die *Systemresponse* betrug etwa 60 fs. Die durchgezogenen Kurven stellen Fits der Daten dar; $\lambda_{anr.} = 615 \text{ nm}$.

ves Signal zu erkennen, dass mit 10..80 fs zerfällt. Zusätzlich tritt eine zweite Zeitkonstante von 130..500 fs auf, die einen Signalanstieg mit kleiner Amplitude beschreibt. In den Kinetiken, die im Bereich dominierender SE liegen, ist ein Signalanstieg von etwa 90 fs bei 720 nm zu beobachten. Bei 690 nm ist eine Anstiegszeit bzw. ein verzögerter, instantaner Anstieg von etwa 40 fs und eine weitere Anstiegszeit um 180 fs mit kleiner Amplitude zu sehen. Da die *Systemresponse* bei diesen Messungen um 60 fs lag und zudem die spektralen Beiträge der ESA, SE und des Bleichsignals stark überlagern (siehe Abschnitt 3.3.4), kann wiederum nur die Aussage getroffen werden, dass mindestens eine Zeitkonstante vorliegt. Der Mittelwert der Fits ergibt $180 \pm 80 \text{ fs}$.

Führt man analog zur Auswertung bei Anregung in der Hauptabsorptionsbande (um 650 nm) eine Fouriertransformation der Residuen durch, so ergeben sich Banden bei 40, 140, 260, 340, 414, 491, 608, 667 cm^{-1} die in Abbildung 3.35 zu sehen sind. Durch die verringerte Zeitaufösung ist der Bereich, in dem deutlich Banden zu sehen sind, auf den Bereich unterhalb von 500 cm^{-1} eingeschränkt.

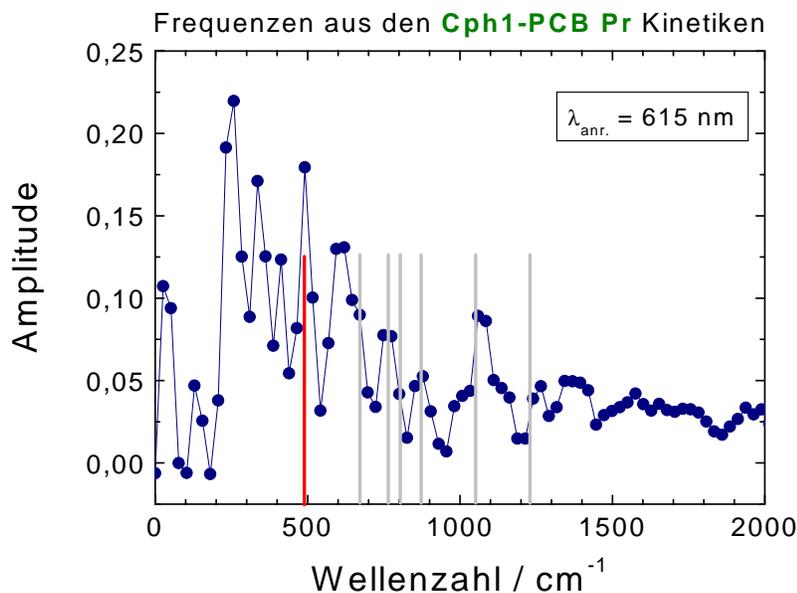


Abbildung 3.35: Summe der Fourierspektren der Residuen der Kinetiken. Die Zeitauflösung entspricht etwa 600 cm^{-1} . Rote Balken liegen im Bereich der Zeitauflösung. Balken repräsentieren Bandenlagen aus RR-Messungen [90].

Eine Zuordnung der kohärenten Wellenpaketdynamik zum angeregten Zustand oder zum Grundzustand kann nicht getroffen werden.

3.3.3.4 Zusammenfassung fs-Zeitbereich

- Der sub-ps Zeitbereich weist mindestens eine Zeitkonstante auf, die bei $180 \pm 80 \text{ fs}$ liegt. Eine Interpretation für diese Zeitkonstante könnte das Auftreten einer Relaxation auf der S_1 -Oberfläche sein.
- Es ist ein Anstieg der Signale von etwa 30..100 fs in dem Spektralbereich zu beobachten, der von der SE dominiert wird.
- Im Spektralbereich von 610 bis 670 nm ist ein Zerfall des negativen Signals mit 10..80 fs zu beobachten, der mit einem verzögerten Anstieg der ESA interpretiert werden könnte.
- Die Kinetiken weisen Beiträge kohärenter Wellenpaketdynamik auf.

3.3.4 Angeregter Zustand und Photoprodukt

Die Form der Differenzspektren von Cph1-PCB P_r setzt sich aus Beiträgen mehrerer Zustände zusammen. Die Moleküle, die lichtinduziert angeregt werden, fehlen im Beitrag der GA des Ausgangszustandes (Cph1-PCB P_r), so dass mit der Form der GA des Ausgangszustandes ein negatives Signal, das Bleichsignal, auftritt. Mit der Wiederbesetzung dieses Grundzustandes wird das negative Signal kleiner. Wenn es möglich ist, die Form des Bleichsignals eindeutig aus den Differenzspektren zu bestimmen, dann kann mit wellenlängenabhängiger Anregung entschieden werden, ob der Grundzustand homogen oder heterogen ist. Weitere negative Beiträge liefert die SE, deren Verlauf in etwa der (ν^3 -korrigierten) stationären Fluoreszenz folgen sollte. Die Absorption des elektronisch angeregten Zustandes (ESA) weist positive Beiträge auf und geht mit dem Signal der SE einher. Neben Beiträgen aus dem elektronisch angeregten Zustand (SE und ESA) können noch Beiträge aus weiteren elektronischen Grundzuständen - den Photoprodukten - auftreten. Die Photoprodukte sind elektronische Grundzustände, die aus dem Ausgangszustand Cph1-PCB P_r über die Anregung in den elektronisch angeregten Zustand gebildet werden. Nach dem Zerfall der SE sollten alle Moleküle in einem elektronischen Grundzustand vorliegen und das Differenzspektrum der Grundzustände, welches auf unserer Zeitskala dem konstanten Differenzspektrum entspricht (300..550 ps), sollte die Absorptionsdifferenz zwischen elektronischem Grundzustand des Ausgangszustands (negativ bei etwa 660 nm) und elektronischem Grundzustand des Photoproduktes (positiv bei etwa 690 nm) aufzeigen. Da in dem gemessenen Zeitbereich kein Zerfall des positiven Signals bei 690 nm zu beobachten ist, kann man davon ausgehen, dass der positive Anteil des ersten Photoproduktes bis in den ns-Bereich beobachtbar ist. Analog zum ersten Photoprodukt in pflanzlichem Phytochrom werde ich dieses erste Photoprodukt mit lumi-R bezeichnen. Das Absorptionsspektrum des lumi-R kann aus dem konstanten Differenzspektrum, bei Kenntnis der Absorption des Ausgangszustandes, direkt berechnet werden. Im ungünstigen Fall, der hier vorliegt, überlappen sich das Bleichsignal und die Absorption des ersten Photoproduktes so stark, dass das konstante Differenzspektrum nur einen kleinen Anteil der einzelnen Absorptionsbeiträge zeigt. Um dennoch Absorptionsspektren von lumi-R zu erhalten, bin ich unabhängig von der Anregungswellenlänge folgendermaßen vorgegangen: Zum konstanten Differenzspektrum wurde so viel von der GA des Cph1-PCB P_r hinzu addiert¹⁴, bis die Form des lumi-R Absorptionsspektrums einigermaßen glatt

¹⁴GA : positives Signal.

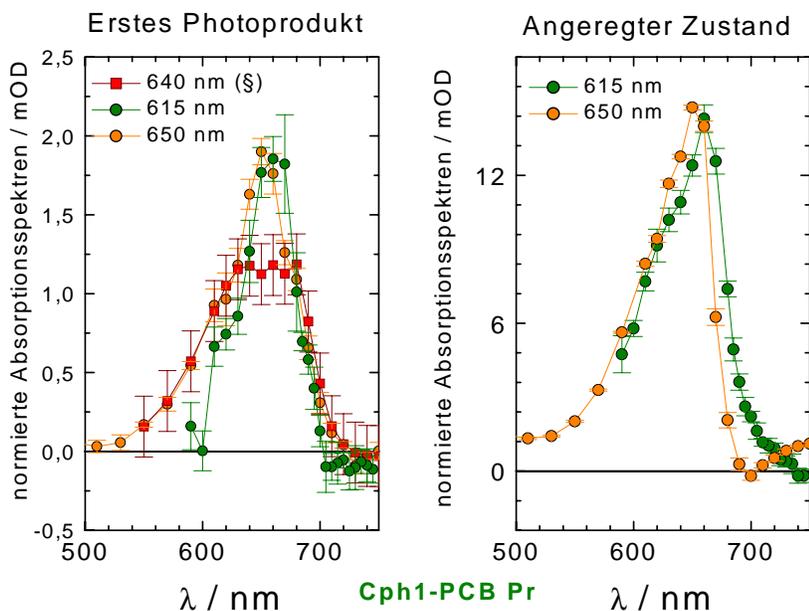


Abbildung 3.36: Auf der linken Seite sind die berechneten Spektren des ersten Photoproduktes zu sehen, die sich aus den Anregungen bei 615nm und 650nm ergeben. Zum Vergleich ist das früheste Spektrum aus zeitaufgelösten sub- μs -Messungen (§)[95] dargestellt (Anregung bei 640 nm). Auf der rechten Seite sind die ermittelten Spektren des angeregten Zustandes dargestellt, wobei berücksichtigt werden muss, dass nur der minimale Anteil der Fluoreszenz bestimmbar ist. Die in der Legende aufgeführten Wellenlängen bezeichnen jeweils die Anregungswellenlängen.

war und nur ein Maximum (eventuell mit Schulter) aufwies. Die resultierenden lumi-R Absorptionsspektren sind in Abbildung 3.36 dargestellt. Das orangefarbene Spektrum in Abbildung 3.36 links zeigt das lumi-R Absorptionsspektrum, welches sich nach Anregung bei 650 nm ergibt und das grüne Spektrum in Abbildung 3.36 links zeigt das lumi-R Spektrum, welches sich nach Anregung bei 615 nm ergibt. Zusätzlich ist in roter Farbe in Abbildung 3.36 links das lumi-R Absorptionsspektrum abgebildet, welches aus sub- μs -Messungen der AG Prof. Heyn gewonnen wurde [95]. Alle lumi-R Spektren, sind auf das berechnete Spektrum bei $\lambda_{anr.} = 650$ nm normiert¹⁵. Es ist zu erkennen, dass alle spektralen Verläufe im Rahmen des Fehlers übereinstimmen. Die Absorption von lumi-R hat ein Maximum zwischen 650 und 660 nm und weist eine spektral Halbwertsbreite (FWHM) von 53.66 nm auf. Das gesamte Absorptionsspektrum erstreckt sich von etwa 560 bis 710 nm und hat bei 680 nm einen Extinktionskoeffizienten, der mit dem von Cph1-PCB P_r übereinstimmt ($\epsilon_{lumi-R}(680nm) \approx 39600 \frac{1}{Mcm}$).

¹⁵Das abgeflachte Maximum des lumi-R Spektrums aus den ns-Messungen könnte auf Anregung des lumi-R durch den ns-Anregungsimpuls zurückzuführen sein.

Daraus ergibt sich, dass der maximale Extinktionskoeffizient von lumi-R etwa um den Faktor 0,8 kleiner ist als der maximale Extinktionskoeffizient von Cph1-PCB P_r . Die konstanten Differenzspektren weichen im Wellenlängenbereich von 560..630 nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge leicht voneinander ab, weshalb das lumi-R Spektrum bei $\lambda_{anr.} = 615$ nm schon im Bereich um 600 nm auf Null abfällt. Diese Differenz könnte durch Heterogenität des Grundzustands von Cph1-PCB P_r verursacht werden. Da die Signale aber sehr klein sind, ist eine klare Zuordnung der Abweichungen zur Heterogenität im Grundzustand von Cph1-PCB P_r nicht möglich.

Aus dem Beitrag der Grundzustandsabsorption des Ausgangszustands zum lumi-R kann der Anteil des Bleichsignals zu frühen Zeiten berechnet werden. Da die Zerfallszeiten im Bereich von zehn ps liegen, weisen die frühen Differenzspektren von 500 fs bis 1,9 ps fast nur Anteile der ESA, SE und des GA auf. Da aus statischen Absorptionsdifferenzmessungen bekannt ist, dass die Quantenausbeute für Cph1-PCB P_{fr} Bildung aus Cph1-PCB P_r bei etwa 15% liegt [46], kann unter der Annahme, dass die Quantenausbeute auch für die Bildung von lumi-R aus P_r 15% beträgt, die Größe des Bleichsignals zu frühen Zeiten berechnet werden. Ausgehend von einem Mittelwert der frühen Differenzspektren von 0,5 bis 1,9 ps wird das Bleichsignal¹⁶ und gerade so viel SE abgezogen¹⁷, dass das resultierende Signal der ESA rein positiv ist. Diese Bestimmung der ESA ist nicht eindeutig, da der Anteil der SE an den Differenzspektren durchaus größer sein kann. In Abbildung 3.36 rechts sind die derart berechneten ESA-Spektren aufgeführt. Das grün gefärbte Spektrum in Abbildung 3.36 ergibt sich bei Anregung um 615 nm, wobei zur Berechnung der minimalen Anteil der SE verwendet wurde (GA:SE = 2,95:1), der nötig ist, damit das Spektrum ESA überall positiv ist. Das andere Spektrum ist aus Messungen mit der Anregungswellenlänge 650 nm gewonnen worden. Das orange Spektrum in Abbildung 3.36 erhält man, wenn die minimale SE verwendet wird (GA:SE = 2,6:1). Wie groß der Anteil der SE wirklich ist, kann aus den vorliegenden Messungen nicht entschieden werden. Für den Fall, dass die Quantenausbeute von P_r nach lumi-R zu 100% angenommen würde und man einen minimalen Anteil der GA zur Berechnung der ESA ansetzt, ergibt sich bei $\lambda_{anr.} = 650$ nm ein Verhältnis von GA:SE = 1:2. Selbst in diesem Fall liegt das Maximum der ESA um 650 nm. In unseren Messungen deutet jedoch nichts darauf hin, dass die Quantenausbeute der Reaktion zu lumi-R so groß sein könnte. Aus den Berechnungen mit 15% Umsetzung der angeregten Moleküle

¹⁶Bleichsignal : negatives Signal.

¹⁷SE : negatives Signal.

nach lumi-R ergibt sich, dass sich die ESA Spektren darin unterscheiden, dass die bei 615 nm angeregten ESA Spektren um 5 bis 10 nm gegenüber den bei 650 nm angeregten ESA Spektren auf der niederenergetischen Seite verbreitert sind. Damit liegen die Absorptionsmaxima um 655 und 665 nm für 650 und 615 nm Anregung. Die spektralen Halbwertsbreiten (FWHM) betragen etwa 64 und 72 nm bei 650 und 615 nm Anregungswellenlänge. Die Verbreiterung der ESA auf der niederenergetischen Seite bei $\lambda_{anr.} = 615$ nm könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die höherenergetische Anregung eine Verteilung der angeregten Zustände auf höherenergetische Minima auf der S_1 -Oberfläche ermöglicht wird. Dadurch wird der $S_1 \rightarrow S_n$ -Übergang niederenergetischer und eine Verbreiterung der SE auf der höherenergetischen Seite wäre die Folge.

3.3.4.1 Zusammenfassung

- Die Berechnung des ersten Photoproduktes (lumi-R) und der Absorption des elektronisch angeregten Zustands ist schwierig und nicht eindeutig, da sich die Spektren alle sehr stark überlagern.
- Das lumi-R Spektrum stimmt für beide Anregungswellenlängen im Rahmen des Fehlers überein und weist ein Absorptionsmaximum zwischen 650 und 660 nm mit einer spektralen Halbwertsbreite (FWHM) zwischen 55 und 65 nm auf. Die lumi-R Spektren zeigen große Ähnlichkeit mit dem Absorptionsspektrum von P_r .
- Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{lumi-R}(680nm)$ ist bei 680 nm so groß wie der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{GA}(680nm) \approx 39600 \frac{1}{Mcm}$ der GA von P_r . Der maximale Extinktionskoeffizient von lumi-R ist etwa um den Faktor 0,8 kleiner als der maximale Extinktionskoeffizient der GA von P_r .
- Die ESA weist Maxima im Bereich von 655 und 665 nm bei Anregung mit 650 und 615 nm auf. Eine Verbreiterung um 5 bis 10 nm zu längeren Wellenlängen des ESA Spektrums bei höherenergetischer Anregung scheint beobachtbar zu sein. Die spektralen Halbwertsbreiten betragen etwa 64 und 72 nm. Bei der Bestimmung des spektralen Verlaufs der ESA kommt zu den Schwierigkeiten des starken spektralen Überlapps der beitragen Komponenten noch hinzu, dass der Beitrag der SE nicht genau bestimmt werden kann.

3.3.5 Anregung bei 390 nm

Im Grundzustandsabsorptionsspektrum von Cph1-PCB P_r (in Abbildung 1.6) ist neben der Absorptionsbande bei 660 nm mit Schulter um 615 nm auch noch die Soret-Bande um 360 nm zu sehen. Um zu überprüfen, ob durch Anregung in der Soret-Bande eventuell völlig andere Zerfallskanäle als bei Anregung in der Hauptabsorptionsbande auftreten, wurde Cph1-PCB P_r auf der niederenergetischen Seite der Soret-Bande angeregt und bei 680 nm abgetastet. Die resultierende Kinetik wurde mit der Kinetik verglichen, die sich bei Anregung in der Hauptabsorptionsbande (um 660 nm) ergibt (siehe Abbildung 3.37). Nachdem die Amplituden

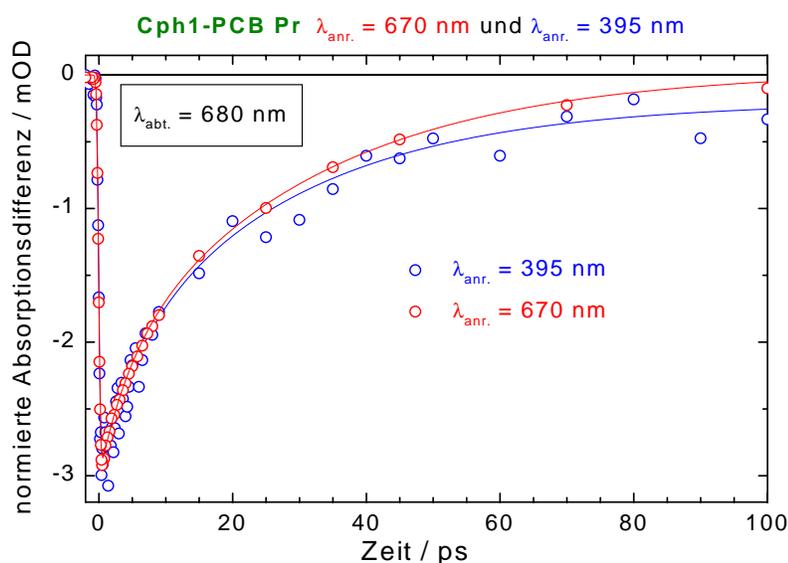


Abbildung 3.37: Kinetiken von Cph1-PCB P_r bei Abtastwellenlängen von 680 nm, angeregt in der Hauptabsorptionsbande bei 670 nm (rote Kreise) und in der Soret-Bande bei 395 nm (blaue Kreise). Die blaue und rote Kurve ergeben sich aus 2 Exp.-Fits. Im angegebenen Zeitbereich beträgt die maximale Abweichung zwischen den Absorptionsdifferenzsignalen 7%. Die Messungen wurden mit dem Weißlicht-Weißlicht Aufbau durchgeführt.

aufeinander normiert wurden, ist zu sehen, dass im Zeitbereich bis 100 ps beide Kinetiken einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen und im 95%-Vertrauensbereich übereinstimmen. Daraus lässt sich schließen, dass sich keine substantiellen Änderungen zwischen Anregung in der Hauptabsorptionsbande und der Soret-Bande ergeben.

3.3.6 Diskussion der Ergebnisse an Cph1-PCB P_r

3.3.6.1 Einführung

Die Messergebnisse der zeitaufgelösten Absorptionsdifferenzmessungen an Cph1-PCB P_r sind in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellt worden. Aus dem entstandenen Gesamtbild wird in diesem Abschnitt ein Modell für die Dynamik der Primärreaktion entwickelt, welches im Einklang mit eigenen und in der Literatur veröffentlichten Messergebnissen steht. Dazu wird das Modell vorgestellt und die daraus folgenden physikalischen Eigenschaften werden mit den Messdaten an Cph1-PCB P_r verglichen. Daran schließt sich eine Einbettung in die Dynamik der Primärreaktionen verwandter Systeme, nämlich Cph1-PEB, freiem PCB in Lösung und Haferphytochrom an. Die Messergebnisse an Cph1-PEB werden zur Charakterisierung der Isomerisierung in Cph1-PCB herangezogen. Danach werden Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Reaktionsdynamik von freiem PCB in Lösung und Cph1-PCB P_r an Hand (in der Literatur) veröffentlichter und eigener Daten herausgearbeitet und abschließend werden verschiedene für Haferphytochrom P_r vorgeschlagene Modelle der Reaktionsdynamik mit den Ergebnissen an Cph1-PCB P_r verglichen.

3.3.6.2 Modell der Primärreaktion von Cph1-PCB P_r

Das favorisierte Potentialschema, dem das Modell zugrunde liegt ist in Abbildung 3.38 skizziert und wird im Folgenden beschrieben: Der Grundzustand von Cph1-PCB P_r weist eine schmale Verteilung auf, da die Reaktionsdynamik in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge kaum beeinflusst wird (vgl. Tabelle 3.7). Aus dem Grundzustand heraus findet nach lichtinduzierter Anregung auf der S_1 -Oberfläche eine schnelle Schwingungsrelaxation des Chromophors und eine Umorientierung der Proteinumgebung statt, die mit (mindestens) einer Zeitkonstante von 150 fs verknüpft ist. Die S_1 -Oberfläche, in deren Minimum der angeregte Zustand relaxiert, ist nicht für jedes Cph1-PCB P_r Proteinmolekül identisch, sondern weist eine Verteilung auf. Diese Verteilung wird zum einen durch die verschiedenen Proteinkonformationen im Grundzustand und zum anderen durch die Umorientierung der Aminosäureseitenketten und gegebenenfalls Wassermoleküle im Protein, besonders im Bereich der Bindungstasche, erzeugt, die auf die Störung durch den elektronisch angeregten Chromophor reagieren. Je höher die Anregungsenergie ist, desto größer ist die Störung und damit die Variation der Reaktion der Proteinumgebung. Das führt dazu, dass sich eine breitere Verteilung

Cph1-PCB P_r gibt es starke Hinweise auf eine Temperaturabhängigkeit der Isomerisierungsrate, so dass eine Potentialbarriere angenommen wird, die überwunden werden muss, bevor eine Isomerisierung stattfindet. Die Reaktionskoordinate in Abbildung 3.38, die den Reaktionsweg der Z,E-Isomerisierung nach lumi-R beschreibt, hat erst mit der Überwindung der Potentialbarriere Anteile in Richtung des Drehwinkels um die $C_{15} = C_{16}$ Doppelbindung. Auf der S_1 -Hyperebene hat die Barriere die Form eines Sattelpunktes. Es wird beobachtet, dass die kohärente Wellenpaketdynamik im angeregten Zustand von P_r keinen Einfluss auf die Isomerisierung hat. Im folgenden werden die einzelnen angesprochenen Eigenschaften des Modells diskutiert:

Grundzustandsheterogenität:

Die Annahme, dass der Grundzustand von Cph1-PCB P_r heterogen ist, impliziert eine Verteilung von verschiedenen Grundzustandsabsorptionsspektren, deren Summe das Cph1-PCB P_r Absorptionsspektrum in Abbildung 1.6 ergibt. Wird die Photoreaktion von $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen $\lambda_{anr.}$ induziert, dann sollten sich abhängig von $\lambda_{anr.}$ unterschiedliche Differenzspektren zwischen P_r und P_{fr} ergeben. Da dieser Effekt in statischen Messungen an Cph1-PCB nicht beobachtet worden ist, muss geschlossen werden, dass entweder die Grundzustandsheterogenität klein ist, bzw. gar nicht auftritt oder auf der Zeitskala der Photoreaktion $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$ eine Äquilibrierung eintritt. Hinweise auf eine Heterogenität zeigen dagegen die konstanten ZAS, bzw. die Differenzspektren zwischen Cph1-PCB P_r und lumi-R, deren negativer Anteil bei Anregung mit 615 nm auf der höherenergetischen Seite breiter ist als bei Anregung mit 650 nm (siehe Abbildung A.26). Die nahe liegende Interpretation, dass um 615 nm zunehmend anders absorbierende P_r Grundzustände angeregt werden als bei 650 nm, widerspricht allerdings der Beobachtung, dass der Nulldurchgang der Differenzspektren zwischen P_r und lumi-R bei beiden Anregungswellenlängen gleich bleibt (680 nm). Da die Signale im Differenzspektrum klein sind (siehe Abbildung A.26 im Anhang), kann man nicht von signifikanten Unterschieden sprechen, so dass eine Heterogenität des P_r Grundzustandes als schmale Verteilung angenommen wird.

Schnelle Relaxation, Stokesshift:

Tritt eine spektrale Verschiebung zwischen dem Maximum der Grundzustandsabsorption und der stationären Fluoreszenz auf (Stokesshift), ist zu erwarten, dass in hoch zeitaufgelösten *Pump-Probe* Messungen die Entstehung des Stokesshiftes zeitlich aufgelöst werden kann. Dabei sollte die SE zu niederenergetischen Wellenlängen verschoben werden, mit entsprechenden Konsequenzen für die Gesamtsi-

gnalstärke bei unterschiedlichen Wellenlängen (vgl. Abschnitt 3.3.2.3). Gleichzeitig sollte eine Verschiebung der ESA zu höherenergetischen Wellenlängen mit derselben Zeitkonstante stattfinden, wenn die S_2 -Potentialoberfläche konstant bleibt. Die Messungen im fs-Zeitbereich zeigen bei Anregung um 650 und 615 nm einen schnellen Zerfall des Bleichsignals, einen Anstieg im Spektralbereich, in dem die SE dominiert und einen Anstieg der ESA auf ihrer höherenergetischen Seite (vgl. Abschnitte 3.3.2.3, 3.3.3.3). Durch die starke spektrale Überlagerung des Bleichsignals, der SE und der ESA können die Verschiebungen der einzelnen Beiträge nicht getrennt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass mindestens eine Zeitkonstante von etwa 150 fs mit der Relaxation verbunden ist. Nach Abklingen dieser Zeitkonstante ist keine weitere spektrale Änderung der Differenzspektren, außer dem Zerfall des Bleichsignals, der SE und der ESA und dem Anstieg des Photoproduktes (auf der ps-Zeitskala) zu sehen.

Heterogenität des angeregten Zustands:

Nach der schnellen Relaxation auf den energieverteilten S_1 -Oberflächen befindet sich das System in den jeweiligen Energieminima. Zwei unterschiedliche Typen von Heterogenität können im angeregten Zustand auftreten:

- (a) Es existieren zwei (oder mehrere) klar voneinander getrennte Formen der S_1 -Oberflächen (Zustände), die alternativ oder sequentiell besetzt werden¹⁸. Durch die unterschiedliche Lage der Minima sollten getrennte Zerfallszeiten und dazu unterschiedliche ZAS beobachtet werden. Mit den verschiedenen Zuständen könnten auch verschiedene Reaktionswege assoziiert sein und unterschiedliche Quantenausbeuten auftreten.
- (b) Es liegt eine kontinuierliche energetische Verteilung von S_1 -Oberflächen (und Minima) vor. Die Zerfallszeit ist kontinuierlich verteilt und es gibt nur ein ZAS. Je breiter die energetische Verteilung ist, desto breiter ist die Verteilung der Zerfallszeiten und der spektralen Form von SE und ESA. Die Quantenausbeute sollte näherungsweise unabhängig von der Anregungswellenlänge sein.

Aus den Messdaten geht hervor, dass Typ (b) zu bevorzugen ist, da zum einen nur eine spektrale Form für ein (nicht konstantes) ZAS bestimmt werden kann und zum anderen die höherenergetische Anregung von Cph1-PCB P_r zu einer erhöhten spektralen Breite der ESA auf der niederenergetischen Seite und der SE auf der höherenergetischen Seite [96] führt (siehe Abbildung A.24 und A.25

¹⁸Dies könnten z.B. zwei verschiedene angeregte Zustände sein.

im Anhang und Abschnitte 3.3.3.2 und 3.3.2.2). Eine Änderung der Quantenausbeute in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge ist nicht beobachtbar. Dennoch kann Typ (a) nicht ausgeschlossen werden, da die Messdaten auch mit zwei Zerfallszeiten beschrieben werden können.

Potentialbarriere:

Das Vorhandensein einer Potentialbarriere von etwa $5.4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$, die für die Photoreaktion überwunden werden muss, ergibt sich aus stationären Fluoreszenzmessungen nach [51]. Aus der Größe der Aktivierungsenergie lässt sich im Vergleich zu Haferphytochrom P_r schließen, dass auch die Zerfallszeit für Cph1-PCB P_r im ps-Zeitbereich liegen sollte.

Isomerisierung:

Aus Resonanz Raman Messungen an Haferphytochrom P_r ist geschlossen worden [34], dass eine Z,E Isomerisierung mit der Bildung des ersten Photoproduktes einhergeht. Da die Resonanz Raman Daten von Cph1-PCB P_r und Haferphytochrom P_r gut übereinstimmen [49], ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Z,E-Isomerisierung beim Übergang von P_r nach lumi-R stattfindet. Da das kinetische Verhalten von Cph1-PCB P_r genau in der Bildung des ersten Photoproduktes von dem kinetischen Verhalten von Cph1-PEB abweicht (siehe Abschnitt 3.2.3), das überhaupt keine ps-Zeitkonstanten aufweist und der signifikante Unterschied der beiden Chromophore PCB und PEB in der $C_{15} = C_{16}$ Doppelbindung besteht¹⁹, unterstützen die Vergleichsmessungen an Cph1-PEB die Annahme, dass in lumi-R ein, um die $C_{15} = C_{16}$ Doppelbindung, isomerisierter Chromophor vorliegt.

Vergleich mit Cph1-PEB:

Der Vergleich der Cph1-PCB P_r Kinetiken mit den von Cph1-PEB zeigt, dass analog zu den Beobachtungen in Cph1-PCB P_r auch in Cph1-PEB eine oder mehrere Zeitkonstanten auftreten, die unterhalb 1 ps liegen. Die für Cph1-PEB bestimmten Zeitkonstanten betragen etwa 50 und 150 fs, wobei die Amplitude der 150 fs Komponente in Cph1-PEB viel geringer ist als in Cph1-PCB P_r . Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Verteilung der Anregungsenergie auch auf den Ring D in Cph1-PCB P_r einen stärkeren Beitrag der Proteinrelaxation und einen größeren Stokesshift von etwa 20 nm statt ≈ 5 nm in Cph1-PEB verursacht²⁰. Die einzige weitere beobachtete Zerfallszeit in Cph1-PEB von etwa 2 ns liegt in derselben Größenordnung wie die strahlende Lebensdauer von

¹⁹Der Unterschied in der Vinylgruppe zwischen PCB und PEB hat keinen Einfluss auf die Isomerisierung, wie aus Vergleichen zwischen PCB und PΦB geschlossen werden kann.

²⁰Bei 293 K, vergleiche dazu Abbildungen 3.8 und 3.17

Cph1-PCB P_r .

Vergleich mit PCB in Lösung:

Messungen am freien Chromophor PCB in Lösung (Methanol mit 0,3% TEA) ergaben Zeitkonstanten unter 1 ps von etwa 220 fs (und 30 fs), wohingegen im Bereich über 1 ps Zeitkonstanten von $\tau_1 = 3,6 \pm 0,6$ ps und $\tau_2 \approx 26$ ps gefunden wurden (Abbildungen A.27 und A.28). Im Gegensatz zum Cph1-PCB P_r können die PCB Kinetiken nicht mit einer (einzigen) Verteilungsfunktion von Ratenkonstanten $f(k)$ gefittet werden, da im freien PCB-Chromophor in Lösung zusätzlich zur Zeitkonstante τ_2 deutlich eine Zeitkonstante τ_1 um 4 ps auftritt. Bei Variation der Anregungswellenlänge ändert sich das Verhältnis der Amplituden, die den Zerfallszeiten τ_1 und τ_2 zugeordnet sind, untereinander stark, was eine Heterogenität des Grundzustandes des freien PCB's in Lösung, wie es von Bischoff et al. [71, 97] vorgeschlagen wird, unterstützt. Aus NMR-Messungen [97] ergibt sich für die Chromophorstruktur der ≈ 26 ps Komponente eine stark zyklische Struktur, wie sie im Protein nicht vorliegen sollte, da es dort Anzeichen für einen gestreckten Chromophor gibt [34, 98]. Die Zeitkonstante τ_2 variiert stark mit dem Lösungsmittel von etwa 30 ps in Methanol bis 150 ps in HMPT²¹, wobei die Struktur des PCB stärker gestreckt ist, je länger die Zeitkonstante ist [97]. Aus Resonanz Raman Daten wurde geschlossen [34], dass der PCB Chromophor durch das Protein in eine gestreckte Konformation gezwungen wird. Deshalb liegt der Schluss nahe, dass durch die Chromophor-Protein Wechselwirkung die langsamere Rate $\frac{1}{\tau_2}$ beschleunigt wird. Ebenso scheint die Proteinumgebung eine Chromophorstruktur, dessen elektronisch angeregter Zustand mit einer Rate von $\frac{1}{4ps}$ zerfällt, zu unterdrücken (siehe Abbildung A.29 im Anhang).

3.3.6.3 Vergleich mit Haferphytochrom P_r

Im Vergleich der Ergebnisse mit Haferphytochrom wird im Folgenden hauptsächlich auf die publizierten zeitaufgelösten *Pump-Probe* Messungen von Hermann und Mitarbeiter, Mathies und Mitarbeiter und Holzwarth und Mitarbeiter eingegangen. Eigene Testmessungen an Haferphytochrom P_r ergaben, dass sich auch bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen, die Kinetiken sowohl mit einem 2 Exp.-Fit als auch mit einem Verteilungs.-Fit zufrieden stellend fitten lassen. Aus den Messungen, die mit dem Weißlicht-Weißlicht Aufbau²² durchgeführt wurden und auch Anisotropieeffekte aufweisen könnten, ergeben sich analog zu den Er-

²¹Hexamethylphosphorsäuretriamid

²²Die Polarisation des Anregungsimpulses ist parallel zu der des Abtastimpulses.

gebnissen an Cph1-PCB P_r Zerfallszeiten, die um 4 und 30 ps liegen und kürzer sind, als die Zerfallszeiten aus NOPA-NOPA Messungen: 21 ± 4 ps und 103 ± 60 ps, bei denen Anisotropieeffekte vernachlässigbar sind.

Sub-ps und ps *Pump-Probe* Messungen, die von **Mathies und Mitarbeiter** [42] an Haferphytochrom P_r durchgeführt wurden, wurden derart interpretiert, dass eine einzige Zeitkonstante von 24 ps ausreicht, um die ps-Reaktionsdynamik zu beschreiben. Eine Beschreibung mit zwei Zeitkonstanten von 13 und 44 ps (mit ähnlichen Amplituden) verbesserte den χ^2_{MIN} -Wert nur um 9% bis 20%. Die weitere Zeitkonstante soll durch die Kinetik eines verkürzten oder denaturierten Haferphytochroms verursacht werden, welches durch Photodegradation entsteht und bei etwa 640 nm absorbiert. Als Folge dieses Photodegradationsprozesses ist das Bleichsignal bei höherenergetischer Anregung auf der höherenergetischen Seite breiter und der Anteil des Degradationsproduktes soll qualitativ dem Anteil der weiteren Zeitkonstanten (und der prozentualen Verbesserung des χ^2_{Min} Wertes) entsprechen. Fittet man sowohl meine Testmessungen an Haferphytochrom P_r ($\lambda_{abt.} = 680 \text{ nm}$) als auch die Messungen an Cph1-PCB P_r mit einer Exponentialfunktion, so kann man deutliche systematische Abweichungen des 1 Exp.-Fits von der Kinetik erkennen. Im Haferphytochrom P_r ergeben sich prozentuale χ^2_{MIN} -Abweichungen von $\approx 15\%$ und in Cph1-PCB P_r von 200 bis 400%. Im Verlauf beider Messungen wurden in den verwendeten Proben keine Änderungen des Grundzustandsabsorptionsspektrums von P_r festgestellt und es wurden keine Hinweise in den Kinetiken von Cph1-PCB P_r gefunden, die auf die Bildung eines Degradationsproduktes mit unterschiedlicher Zeitkonstante und verändertem ZAS schließen lassen. Die Ergebnisse von Andel et al. [42] bezüglich einer Photodegradation könnten so interpretiert werden, dass die Degradationsprodukte in ihren Messungen deshalb entstehen, weil Intermediate angeregt werden. Dies kann in meinen Messungen weitgehend ausgeschlossen werden, da im Mittel etwa 2 Sekunden (im Gegensatz zu 200 ms bei Andel et al.) vergehen, bis dasselbe Probevolumen erneut angeregt wird. Die ermittelten Zeitkonstanten von 24 ps bzw. 13 und 44 ps für den 1 Exp.-Fit bzw. 2 Exp.-Fit passen sehr gut mit den Fitergebnissen an Cph1-PCB P_r in Tabelle 3.4 überein. Das könnte man so interpretieren, dass die Messergebnisse von Andel et al. meinem Ergebnissen entsprechen, bis auf den Punkt, dass bei Andel et al. eventuell Intermediate angeregt wurden, die eine weiterführende Interpretation der Messdaten verhinderte.

Pump-Probe Absorptionsdifferenzmessungen an Haferphytochrom P_r von **Hermann und Mitarbeiter** ergaben im ps-Zeitbereich Zeitkonstanten von 2 bis 3 ps und etwa 30 ps mit etwa 10 nm gegeneinander verschobenen Maxima der zer-

$\frac{\lambda_{anr.}}{nm}$	Fitfunktion	optimale Werte	95% - Bereiche
650	2 Exp.	$\tau_1 = 11,7 ps$; $\tau_2 = 48 ps$	$\tau_1 = 8,0..14,9 ps$; $\tau_2 = 32..88 ps$
	Verteilung	$\tau = 15,7 ps$; $n = 1,9$	$\tau = 14,5..17,1 ps$; $n = 1,5..2,7$
615	2 Exp.	$\tau_1 = 15,1 ps$; $\tau_2 = 97 ps$	$\tau_1 = 5,1..22,0 ps$; $\tau_2 = 35..300 ps$
	Verteilung.	$\tau = 19,6 ps$; $n = 1,32$	$\tau = 15,4..23,5 ps$; $n = 0,8..2,0$

Tabelle 3.7: Im direkten Vergleich sind die Fitergebnisse der Cph1-PCB P_r - Daten für 650 nm und 615 nm Anregung dargestellt. Die Ergebnisse des 2 Exp.-Fits können als Maß für die Breite der Verteilungsfunktion $f(k)$ angesehen werden.

fallsassozierten Spektren (660 und 673 nm) [43, 99]. Eine sub-ps Zeitkonstante wurde zu 150.360 fs bestimmt und ein verzögerter Anstieg der SE auf der niederenergetischen und ein verzögertes Auftreten der ESA auf der höherenergetischen Seite der Grundzustandsabsorptionsbande von P_r wurde beobachtet [100]. Das Maximum der ESA liegt zwischen 660 und 700 nm und lumi-R weist ein Absorptionsmaximum um 680 nm auf. Aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurden Zeitkonstanten von 14 und 45 ps ermittelt [101]. Das vorgeschlagene Modell weist zwei voneinander getrennte angeregte Zustände P_r^* und P_r^{**} auf, die sequentiell besetzt werden und mit dem Zerfall von P_r^{**} wird die Bildung von lumi-R ermöglicht. Die gemessenen Zeitkonstanten von 3 und 30 ps stimmen mit meinen Ergebnissen aus dem Weißlicht-Weißlicht Aufbau an Cph1-PCB P_r überein, in dem die Polarisation des Abtastimpulses parallel zur Polarisation des Anregungsimpulses eingestellt war. Dies war auch bei den Absorptionsdifferenzmessungen von Hermann und Mitarbeiter der Fall, so dass sich der Unterschied in den ermittelten Zeitkonstanten, insbesondere die 3 ps Komponente, eventuell auf Anisotropieeffekte zurückführen lässt. Die Zeitkonstanten, die sich aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen ergeben stimmen gut mit unseren Zeitkonstanten aus dem NOPA-NOPA und NOPA-Weißlicht Aufbau überein (hier treten keine Anisotropieeffekte auf, siehe Abbildung A.29 im Anhang). Wahrscheinlich sind in Haferphytochrom P_r und Cph1-PCB P_r Anisotropieeffekte dafür verantwortlich, dass eine Zeitkonstante von etwa 3 ps beobachtet wird und eine noch ausstehende Anisotropiestudie sollte tiefer gehende Erkenntnisse über die Lage des Übergangsdipolmomentes direkt nach der Anregung liefern.

Zum Schluss möchte ich noch Vergleichsmessungen von **Holzwarth und Mitarbeiter** an Haferphytochrom P_r heranziehen, die sowohl *Pump-Probe* Absorptionsdifferenzmessungen [44] als auch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen durchgeführt haben [102, 103]. Die Fluoreszenzmessungen liefern im ps-Zeitbereich anregungswellenlängenabhängige Zeitkonstanten²³ von $\tau_1 = 5 ps$, $\tau_2 = 45 ps$ und

$\tau_3 = 194 \text{ ps}$ bei $\lambda_{anr.} = 640 \text{ nm}$ und $\tau_1 = 11 \text{ ps}$, $\tau_2 = 44 \text{ ps}$ und $\tau_3 = 160 \text{ ps}$ bei $\lambda_{anr.} = 660 \text{ nm}$ mit spektralen Maxima der jeweiligen Fluoreszenzspektren zwischen 680 und 690 nm. Eine Änderung der ps-Zeitkonstanten im Temperaturbereich von 275 bis 298 K wurde nicht beobachtet. Aus den Absorptionsdifferenzmessungen wurde auf eine Verteilung von Ratenkonstanten zwischen $\frac{1}{15 \text{ ps}}$ und $\frac{1}{50 \text{ ps}}$ geschlossen (siehe unten). Im sub-ps Zeitbereich sind zwei Zeitkonstanten von etwa 70 und 150 fs beobachtet worden. Bis in den ps-Zeitbereich sind zusätzlich Oszillationen zu sehen, die durch kohärente Wellenpaketdynamik im elektronisch angeregten Zustand erzeugt werden. Sowohl die Ergebnisse aus den Fluoreszenzmessungen als auch aus den Absorptionsdifferenzmessungen stimmen sehr gut mit meinen Ergebnissen an Cph1-PCB P_r überein. Die Änderungen der Fluoreszenzzeitkonstanten τ_1 und τ_3 bei $\lambda_{anr.} = 640 \text{ nm}$ und die kaum unterschiedlichen Spektren unterstützen die Annahme, dass es eine einzige Verteilungsfunktion $f(k)$ gibt, die bei höherenergetischer Anregung breiter wird. Die Breite der Verteilung, die sich aus den Absorptionsmessungen an Haferphytochrom P_r ergibt, reicht von etwa 15..50 ps und stimmt gut mit den Cph1-PCB P_r Zerfallszeiten aus dem 2 Exp.-Fits überein (siehe Tabelle 3.7 und Abbildung A.31), wenn man diese als Maß für die Breite der Verteilungsfunktion $f(k)$ heranzieht. Die sub-ps Zeitkonstanten aus Haferphytochrom P_r stimmen ebenfalls gut mit denen aus Cph1-PCB P_r überein, wobei allerdings wegen der starken spektralen Überlagerung von SE, ESA und des Bleichsignals die 50..80 fs Zeitkonstante in Cph1-PCB P_r nicht signifikant bestimmt werden konnte. Das temperaturunabhängige photochemische Verhalten von Haferphytochrom P_r wird mit einer Heterogenität der Grundzustände erklärt [11, 40]. Es liegen zwei Grundzustands-Typen $phyA'$ und $phyA''$ vor, die unterschiedliche Aktivierungsenergien E_a aufweisen. Der Typ $phyA'$ zeigt Photoreaktion bei tiefen Temperaturen und weist eine Aktivierungsenergie von wenigen hundert $\frac{\text{J}}{\text{mol}}$ auf, während der Typ $phyA''$ mit $E_a = 4.5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ erst bei höheren Temperaturen eine Photoreaktion aufweist. Cph1-PCB P_r ist dem Typ $phyA''$ (und einem weiteren Typ $phyB$) ähnlich, der keine Photoreaktion bei tiefen Temperaturen zeigt. Es wird angenommen, dass die relativ hohe Aktivierungsbarriere durch sterische Hinderung des Chromophors durch die Proteinumgebung verursacht wird.

²³Es werden die Werte mit dem Puffer Tris aufgeführt, da dieser Puffer auch in Cph1-PCB verwendet wurde.

3.3.6.4 Zusammenfassung von Cph1-PCB in der P_r Form

Zusammenfassend kann für die Dynamik der Primärreaktion von Cph1-PCB P_r folgendes ausgesagt werden:

- Der Cph1-PCB P_r Grundzustand weist höchstens eine schmale Heterogenität auf.
- Nach Anregung findet eine schnelle Relaxation statt, die mit einer Zeitkonstante um 150 fs (und eventuell einer weiteren um 80 fs) verbunden ist. Danach gibt es keine Hinweise auf weitere Relaxationen im angeregten Zustand.
- Es gibt Hinweise für das Einstellen des Stokesshifts mit einer Zeitkonstante um 80 fs.
- Die Primärreaktion von Cph1-PCB P_r wird am besten mit einer Verteilung von Ratenkonstanten im ps-Zeitbereich beschrieben. Bei höherenergetischer Anregung beobachtet man eine breitere Verteilung.
- Die Z,E-Isomerisierung läuft über eine Verteilung der Ratenkonstanten ab.
- Die Proteinumgebung in Cph1-PCB P_r zwingt den Chromophor wahrscheinlich in eine Geometrie, in der der Zerfallskanal mit der Rate $\frac{1}{4ps}$, der im freien Chromophor in Lösung zu beobachten ist, unterdrückt wird.
- Die Reaktionsdynamik von Cph1-PCB P_r stimmt im Bereich der Zimmertemperatur gut mit der von Haferphytochrom P_r überein.
- Mit dem Zerfall der ESA und SE wird das Photoprodukt lumi-R gebildet. Das Absorptionsspektrum von lumi-R ist nahezu mit dem von P_r identisch und weist eine etwa um den Faktor $\frac{3}{4}$ verringerte (integrale) Extinktion auf. Das Spektrum der ESA weist ebenfalls ein Maximum um 655 nm auf, ist aber deutlich breiter als das P_r Absorptionsspektrum und erstreckt sich von 430 bis 900 nm.
- In der Reaktionsdynamik kann man mit geeigneten Versuchsaufbauten Anisotropieeffekte beobachten, die zur Beobachtung veränderter Zeitkonstanten führen.

3.4 Primärreaktion von Cph1-PCB in der P_{fr} - Form

3.4.1 Ergebnisse

Die Reaktionsdynamik von Cph1-PCB P_{fr} wurde mit dem Weißlicht-Weißlicht Messaufbau bei ausgewählten Abtastwellenlängen untersucht, um festzustellen, ob eine Übereinstimmung der Reaktionsdynamik auch mit Haferphytochrom P_{fr} zu beobachten ist. Die Cph1-PCB Probe, in der ein Gemisch aus den Zuständen P_r und P_{fr} vorlag, wurde bei 727 nm angeregt, um eine P_r Anregung auszuschließen. In Abbildung 3.39 sind drei Kinetiken bei 690, 710 und 760 nm dargestellt. Die Kinetiken bei 690 und 710 nm zeigen beide einen der *Systemresponse* folgenden Anstieg des negativen Signals, das daraufhin mit zwei Zeitkonstanten um 500 fs und 3 ps zerfällt. Nach etwa 15 ps hat das negative Signal einen konstanten Wert angenommen. Da die beiden Kinetiken im Bereich der Grundzustandsabsorption von P_{fr} liegen, ist davon auszugehen, dass der konstante Wert des Bleichsignals den Anteil von P_{fr} darstellt, der die Reaktion nach P_r durchläuft (Vorwärtsreaktion). In der Kinetik bei 760 nm ist der Beitrag des Bleichsignals verschwindend und das mit etwa 700 fs ansteigende positive Signal, zeigt das Auftreten eines neuen Zustandes an. Dieser neue Zustand zerfällt mit etwa 4 ps auf einen konstanten positiven Wert, der der Vorwärtsreaktion zuzuschreiben ist. Ein globaler Fit der Kinetiken liefert Zeitkonstanten von $\tau_1 = 540 \pm 20$ fs und $\tau_2 = 3,2 \pm 0,4$ ps. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Messungen an Haferphytochrom P_{fr} überein, die von Hermann und Mitarbeiter [43, 104, 105] und Holzwarth und Mitarbeiter [44] beschrieben wurden. Dort werden Zeitkonstanten um 3..4,5 ps und 450..650 fs beschrieben, wobei die kurze Zeitkonstante eventuell aus mehreren Zeitkonstanten besteht. Kohärente Wellenpaketdynamik, wie sie von Holzwarth und Mitarbeiter gemessen wurde, konnte in Cph1-PCB P_{fr} noch nicht beobachtet werden. Da sich keine Unterschiede aus den vorliegenden Daten ergeben, wird hier kurz das Modell nach Hermann und Mitarbeiter vorgestellt.

3.4.2 Modell

Das in der Literatur vorgeschlagenen Modell geht von zwei angeregten Zuständen P_{fr}^* und P_{fr}^{**} aus, die sequentiell durchlaufen werden, d.h. nach der Anregung befindet sich das System im Zustand P_{fr}^* und zerfällt von dort mit etwa 550 fs

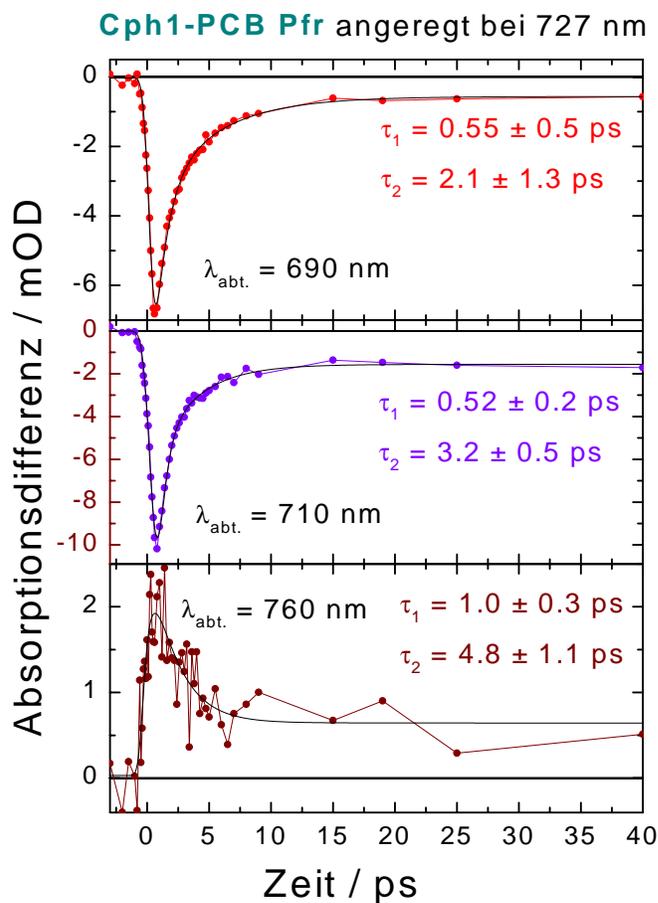


Abbildung 3.39: Kinetiken von Cph1-PCB P_{fr} bei unterschiedlichen Abtastwellenlängen. Die Anregung fand bei 727 nm statt und zusätzlich sind zu den Datenpunkten 2 Exp.-Fits aufgeführt. Die Zerfallszeiten der einzelnen Fits sind in den Grafiken aufgeführt. Ein globaler Fit ergab Zeitkonstanten von $\tau_1 = 540 \pm 20$ fs und $\tau_2 = 3,2 \pm 0,4$ ps.

in den P_{fr} Grundzustand und den angeregten Zustand P_{fr}^{**} . Aus diesem findet mit etwa 3,8 ps eine Wiederbesetzung des P_{fr} Grundzustandes und eine Bildung des ersten Photoproduktes lumi-F statt. Mit der Bildung von lumi-F geht die E,Z-Isomerisierung einher. Der Anteil der angeregten Moleküle der die Vorwärtsreaktion nach lumi-F durchläuft, beträgt etwa 15% [43, 104].

3.5 Zusammenfassung von Cph1-PCB in der P_{fr} und P_r Form

- Es wurde ein kinetisches Modell für die Primärreaktion von Cph1-PCB P_r entwickelt (siehe Abbildung 3.38). Wesentliche Bestandteile dieses Modells sind eine schnelle Relaxation im S_1 -Zustand von etwa 150 fs und eine Verteilung von Ratenkonstanten um etwa $\frac{1}{16ps}$ für die Z,E-Isomerisierung und Bildung des ersten Photoproduktes lumi-R. Die Primärreaktion von Cph1-PCB P_r weist Anisotropieeffekte auf.
- Das erste Photoprodukt, lumi-R, ist auf unserer Zeitskala (bis 550 ps) stabil und stimmt spektral mit dem ersten gemessenen Intermediat aus μs - und sub- μs - Messungen überein [49, 95]. Damit ist die gesamte Photoreaktion von Cph1-PCB P_r charakterisiert. Sie stimmt auch in den übrigen Zeitbereichen mit der Photoreaktion von Haferphytochrom P_r gut überein [49, 95, 50].
- Unterschiede, die zwischen Cph1-PCB P_r und Haferphytochrom P_r bei tiefen Temperaturen²⁴ auftreten, werden wahrscheinlich durch die Heterogenität der P_r Form des Haferphytochroms (phyA' und phyA'') verursacht, die in Cph1-PCB P_r nicht vorliegt.
- Die Primärreaktion von Cph1-PCB P_{fr} ist mit viel kürzeren Zerfallszeiten, nämlich 540 fs und 3,2 ps, verknüpft als Cph1-PCB P_r . Es wird angenommen, dass in der Primärreaktion von P_{fr} zwei elektronisch angeregte Zustände involviert sind und dass sie nahezu barriereelos abläuft. Auch hier zeigt sich die Primärreaktion im wesentlichen gleich derjenigen im Haferphytochrom.
- Es liegt der Schluss nahe, dass bei Zimmertemperatur die Primärreaktionen von Cph1-PCB P_r und Haferphytochrom P_r identisch sind und somit das vorgeschlagene Modell auch für Haferphytochrom P_r anwendbar ist.
- Spektrale Unterschiede in Lage und Stärke der Absorption von der GA von P_{fr} , GA von P_r , lumi-R, ESA und Fluoreszenz bzw. SE zwischen Cph1-PCB und Haferphytochrom werden wahrscheinlich durch Unterschiede in der Proteinumgebung hervorgerufen. Besonders geladene Aminosäureseitenketten könnten dabei eine wichtige Rolle spielen.

²⁴Z.B. in den bei tiefen Temperaturen stabilisierten FT-IR Spektren des frühesten Intermediats

- In Cph1-PCB P_r wurden oszillatorische Anteile auf den Kinetiken beobachtet. Vergleicht man die Schwingungsfrequenzen aus den FT-Spektren der Kinetiken (Abschnitte 3.3.2.3, 3.3.3.3 und Abbildungen 3.11 und A.30) mit den Resonanz Raman Spektren, so liegt der Schluss nahe, dass kohärente Wellenpaketdynamik hauptsächlich aus dem elektronischen Grundzustand beobachtet worden ist. Um zu entscheiden, ob auch Anteile aus dem angeregten Zustand vorliegen, müssen fs-zeitaufgelöste Messungen in einem Spektralbereich durchgeführt werden, in dem (fast) nur ESA zum Signal beiträgt. Aus der sich kaum ändernden Reaktionsdynamik bei Variation der Anregungswellenlänge kann geschlossen werden, dass kohärente Wellenpaketdynamik die Isomerisierung von P_r nach lumi-R nur in geringem Maß (oder gar nicht) beeinflusst. Dies scheint auch in Haferphytochrom P_r der Fall zu sein. Für die Reaktionsdynamik der P_{fr} Form kann dahingehend noch keine Aussage getroffen werden.

