

# Kapitel 4

## Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Analysemethoden der transienten Signale vorgestellt und die Messergebnisse an den Proteinen bR-Wildtyp und bR5.12 präsentiert und diskutiert.

Bei der Analyse der transienten Absorptionssignale werden die bei negativen Verzögerungszeiten auftretenden  $T_2$ -Effekte simuliert und bei positiven Zeiten die Dynamik mit Hilfe von Global Fit und SVD analysiert (Abbildung 4.1).

Die Präsentation der Messergebnisse ist nach den charakteristischen Spektralbereichen aufgeteilt (Kapitel 1.1.1.2): die Resultate aus dem C=C-, C=NH- und C-C-Streckschwingungsbereich werden in Form von Transienten und von zeitaufgelösten Spektren der Absorptionsdifferenzen gezeigt. In allen drei Bereichen wird die Entstehung der positiven Banden, die charakteristisch für die Primärreaktion sind und ein langsamer Rückgang für die Bleichsignale gemessen.

Beim bR5.12 ist es aufgrund der langen  $S_1$ -Lebendauer möglich, die Schwingungsbanden im elektronisch angeregten Zustand spektral und zeitaufgelöst zu verfolgen. Das Absorptionsverhalten bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  im bR-Wildtyp und im bR5.12 deutet darauf hin, dass das Protein unabhängig von der Isomerisierung des Chromophors auf die Lichtabsorption reagiert.

### 4.1 Analyse der transienten Differenzsignale

Die hier vorgestellten IR-Messungen werden in der Zeitdomäne mit einer Zeitauflösung von 200 bis 300 fs durchgeführt; in der Frequenzdomäne wird der ca.  $100\text{ cm}^{-1}$  breite Abtastpuls hinter der Probe mit  $5\text{ cm}^{-1}$  spektral aufgelöst. In Anlehnung an die VIS-Spektroskopie erwartet man kein Signal, wenn der Abtastpuls vor dem Anregungspuls kommt, da die Signale der Photoreaktion nur bei positiven Verzögerungszeiten auftreten. Jedoch zeigen die

**Negative Verzögerungszeiten**

**Positive Verzögerungszeiten**

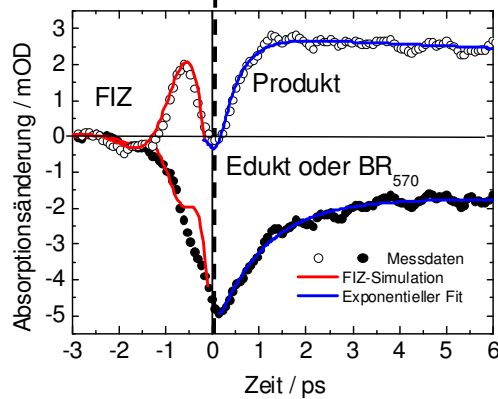
**Kohärente Phänomene:**

Wechselwirkung zwischen den Schwingungsübergängen, dem spektral überlappenden IR-Probeimpuls und dem sichtbarem Anregungspuls

**Inkohärente Phänomene:**

Prozesse der Photoisomerisierung, z.B. transiente Bevölkerung von Reaktionsprodukten

Simulation des gestörten freien Induktionszerfalls (FID).



Fit: Summe von Exponentialfunktionen gefaltet mit der Systemantwort

**Abbildung 4.1:**

Transiente Differenzsignale: Bei negativen Verzögerungszeiten werden die so genannten  $T_2$ -Effekte beobachtet. Dies sind kohärente Signale, die die Signale während der eigentlichen Photoreaktion (positive Verzögerungszeit  $t_D > +150$  fs) nicht beeinflussen. Um sie qualitativ zu erfassen, werden sie simuliert.

Transienten bei negativen Verzögerungszeiten eine wellenzahlabhängige oszillierende Dynamik. Diese so genannten  $T_2$ -Signale werden aber nur bei der frequenzauflösten Detektion sichtbar, da dann das Produkt aus Zeitauflösung und Frequenzauflösung deutlich kleiner wird als der von der Heisenbergschen Unschärferelation vorgegebene Wert. Das beobachtete Phänomen ist die Relaxation einer durch den Abtastpuls aufgebauten kohärenten schwingenden Polarisation.

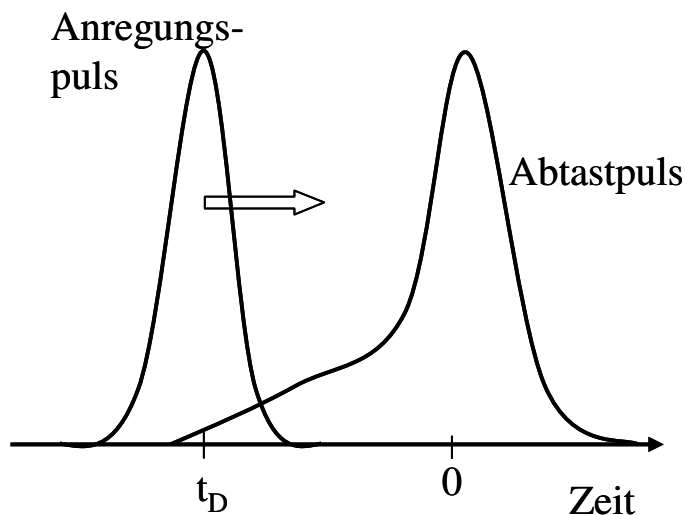
### 4.1.1 Die Relaxation induzierter IR-Polarisation: $T_2$ -Effekte

Ein IR-Puls induziert in einem IR-aktiven Molekül eine kohärente Polarisation. Es liegen also angeregte schwingende Dipole vor. Die Zerfallszeit  $T_2$  dieser Polarisation setzt sich aus der Lebensdauer  $T_1$  des betreffenden Schwingungsniveaus und der "reinen" Dephasierungszeit  $T'_2$  (elastische Stoßprozesse) zusammen:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T'_2} + \frac{1}{2T_1} \quad (4.1)$$

Mit dieser Zeit ist auch die homogene Linienbreite  $\Delta\nu$  der entsprechenden Schwingungsabsorptionsbande verbunden:  $T_2 = 1/(\pi\Delta\nu)$ .

Die Polarisation klingt mit der  $T_2$ -Zeit ab, strahlt dabei in Ausbreitungsrichtung und interferiert mit dem Probepuls. Die  $T_2$ -Effekte haben in der Zeit- wie in der Frequenzdomäne ein ausgeprägtes Muster. Bei der Mittenfrequenz einer Absorptionsbande ist das  $T_2$ -Verhalten monoexponentiell. In den benachbarten Wellenlängen tritt ein oszillatorisches Verhalten auf, das als freier Induktionszerfall (FIZ), wie in der magnetischen Resonanz-Spektroskopie betrachtet werden kann.



**Abbildung 4.2:**

Erzeugung eines kohärenten Signals zu negativen Verzögerungszeiten  $t_D$  ( $t_D < 0$ ). Der Abtastpuls hat in Folge der induzierten Polarisation eine unsymmetrische Verbreiterung erfahren. Es gibt bei  $t_D$  ein Differenzsignal, wenn sich die Schwingungsmode, mit der der Abtaststrahl spektral überlappt, aufgrund der Photoanregung verändert.

Der optische FIZ wird nur dann in den Absorptionsdifferenzen sichtbar, wenn der Anregungspuls eine Absorptionsveränderung der Schwingungsmode verursacht. Dadurch wird der FIZ plötzlich gestört und kann als ein Differenzsignal zwischen angeregter und nichtangeregter Probe detektiert werden, wenn die Breite der Systemantwort kürzer als die betreffende  $T_2$ -Zeit ist. Durch den FIZ bekommt der Abtastpuls einen Nachläufer, wie in der Abbildung 4.2 dargestellt. Der Abtastpuls wird in der Zeitdomäne unsymmetrisch, er klingt an der negativen Flanke mit der  $T_2$ -Zeit ab, die durch die Linienbreite der Absorptionsbande bestimmt wird. Damit wird deutlich, dass die Zeitauflösung im Bereich des Zeitnullpunkts durch die Probenabsorption und nicht durch die Systemantwort begrenzt wird. Diese Effekte treten auf, wenn in der Zeitdomäne die Zeitauflösung  $\Delta t$  kürzer als die  $T_2$ -Zeit ist oder wenn in der Frequenzdomäne die Abtastpulsbreite  $\Delta\nu_{\text{probe}}$  größer als die Breite der Absorptionsbande  $\Delta\nu$  ist.

Für ein genaues Verständnis und für die Interpretation der Differenzsignale wird ein analytisches Modell [Jof1988; Wyn1995; Ham1995] benutzt, mit dem die  $T_2$ -Effekte bei negativen Verzögerungszeiten für die Probenabsorption simuliert werden. Nach Hamm [Ham1994] wird für das Lichtfeld des Probepulses davon ausgegangen, dass sich das einfallende Lichtfeld mit dem aufgrund der Polarisation emittierten Lichtfelds überlagert. Die Absorptionsveränderung der Probe wird für die Simulation durch eine  $\delta$ -förmige

Störung (Anregungspuls) verursacht. Vom Detektor wird die Intensität gesehen:

$$I(\omega) = |E_i(\omega) + E_r(\omega)|^2 = |E_i(\omega)|^2 + |E_r(\omega)|^2 + 2 \operatorname{Re} E_i^*(\omega) E_r(\omega) \quad (4.2)$$

$E_i(t)$ : einfallendes Lichtfeld,  $E_r(t)$ : das vom Medium abgestrahlte Lichtfeld.

Für eine schwach absorbierende Probe wird angenommen, dass  $E_r \ll E_i$  und somit vernachlässigbar ist. Die Intensität wird vom Detektor integral gemessen, so dass die zeitliche Pulsform nicht in das Differenzsignal mit eingehen kann. Es wird jetzt der Fall betrachtet, dass der Anregungspuls die Absorptionsbande verändert. Dann ändert sich  $E_r$  und man erhält für das Differenzsignal:

$$\Delta I_\tau(\omega) = 2 \operatorname{Re} E_i^*(\omega) [E_{r,\tau}(\omega) - E_r(\omega)] \quad (4.3)$$

$E_r$ : abgestrahltes Lichtfeld der ungestörten Probe,  $E_{r,\tau}$ : Lichtfeld, der vom Anregungspuls gestörten Probe,  $\tau$ : Verzögerungszeit zwischen den Pulsen.

$\tau$  soll definitionsgemäß negativ sein, wenn der Abtastpuls die Probe vor dem Anregungspuls erreicht. Die Formel (4.3) für das Differenzsignal stellt eine Interferenz zwischen Abtastpuls und Differenz zwischen  $E_r$  und  $E_{r,\tau}$  dar. Die Änderung der Absorptionsbande wird durch die folgende Funktion beschrieben:

$$G_\tau(t) = 1 - \frac{E_{r,\tau}}{E_r(t)} \quad (4.4)$$

Es werden die Fälle für  $t < -\tau$  betrachtet: ungestörte Probe:  $G_\tau(t) = 0$ , da  $E_{r,\tau} = E_r$  und bei  $t > -\tau$ :  $G_\tau(t) > 0$ .

Man erhält für das Differenzsignal den allgemeingültigen Ausdruck, wenn Formel (4.2) mit  $G_\tau(t)$  und Formel (4.3) unter zweimaliger Anwendung des Faltungssatzes für die Fouriertransformation umgeformt wird:

$$\Delta T_r(\omega) = \frac{I_\tau(\omega)}{I_i(\omega)} = -\frac{2}{E_i^*(\omega) E_i(\omega)} \operatorname{Re} E_i^*(\omega) \int_{-\infty}^{+\infty} G_\tau(\omega') M(\omega - \omega') E_i(\omega - \omega') d\omega' \quad (4.5)$$

$\Delta T_r(\omega)$ : Transmissionsdifferenz

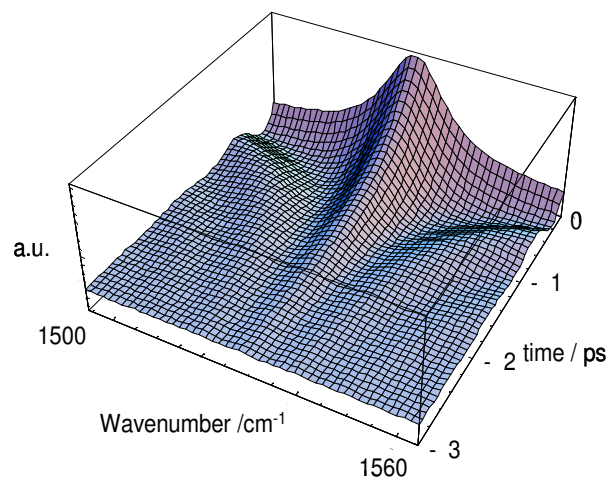
Um die Funktion an Hand eines analytischen Ausdrucks für eine Lorentzlinie mit der Mittenfrequenz  $\omega_a$  diskutieren zu können, wird für den Anregungspuls und für den Abtastimpuls eine  $\delta$ -förmige Pulsform angenommen. Dann ist  $G_\tau(t) = \theta(\tau + t)$  und  $\theta(\tau + t)$  die Heavisidefunktion und  $E_i(\omega) = 1$  und die Integration kann durch die Fouriertransformation ausgeführt werden.

Für  $\tau < 0$  gilt:

$$\Delta T_r(\omega) \propto \exp\left(\frac{\tau}{T_2}\right) \cdot \frac{\frac{\tau}{T_2} \cos(\omega - \omega_a) + (\omega - \omega_a) \sin(\omega - \omega_a) \tau}{(\omega - \omega_a)^2 + (1/T_2)^2} \quad (4.6)$$

Für  $\tau > 0$  gilt:

$$\Delta T_r(\omega) \propto -\frac{1}{(\omega - \omega_a)^2 + (1/T_2)^2} \quad (4.7)$$



**Abbildung 4.3:**

Simuliertes  $T_2$ -Signal vor  $\delta$ -förmiger Störung für eine BR<sub>570</sub>-Bleichbande und der Mittenfrequenz bei 1529  $\text{cm}^{-1}$  mit einer Breite  $\Delta\tilde{\nu} = 16 \text{ cm}^{-1}$ .

In der Abbildung 4.3 ist das simulierte  $T_2$ -Verhalten nach Formel (4.6) dargestellt. Für  $\tau = 0$  erkennt man die Lorentzlinie mit dem Absorptionsmaximum bei  $\omega_a$ . Für  $\tau < 0$  und  $\omega = \omega_a$  fällt das Signal exponentiell mit  $T_2 = 0,6 \text{ ps}$  ab. Für  $\omega \neq \omega_a$  beobachtet man Oszillationen sowohl als Funktion der Zeit als auch als Funktion der Wellenzahl. Man beachte, dass die Einhüllende der Oszillationen aufgrund des zweiten Terms in (4.6) breiter ist als die Bandbreite der Lorentzlinie.

Die Simulation aus Abbildung 4.3 wird nun mit dem experimentell beobachteten spektralen und zeitlichen Verhalten der Schwingungsbanden verglichen. Es zeigt sich gute Übereinstimmung zu den experimentellen Transienten, wie man in den Abbildungen 4.4, 4.9 und 4.12 erkennen kann. Im Fingerprint-Bereich überlagern sich zwei Bleichbanden im Abstand von  $30 \text{ cm}^{-1}$ . In diesem Fall muss für die Simulation die Superposition der  $T_2$ -Effekte der zwei Absorptionsbanden berechnet werden. Für die Bewertung der transienten Daten ist die Simulation von Bedeutung, damit bei der Analyse zwischen kohärenten und

inkohärenten Probensignalen unterschieden werden kann. Die  $T_2$ -Muster haben auch eine Funktion als Konsistenztest für gemessene Differenzspektren.

Weitere mögliche kohärente Signale sind Probenfenstereffekte und die Kreuzphasenmodulation [Zur1996]. Bei Messungen an Leerproben ( $\text{CaF}_2$ ) unter sonst identisch experimentellen Bedingungen werden im Spektralbereich (1000 bis  $1670 \text{ cm}^{-1}$ ) keine Fenstersignale gemessen. Sie sind übrigens von den  $T_2$ -Signalen leicht zu unterscheiden, da sie zeitlich wesentlich schmaler sind.

## 4.1.2 Analysemethoden der transienten Signale

Für die Analyse der Messdaten ist es notwendig überlagernde Prozesse spektral und zeitlich voneinander zu trennen. Ziel ist es, so einen Datensatz mit dem kleinsten Satz an Parametern bestmöglich zu beschreiben. Die Methoden, die hier vorgestellt werden, sind der globale exponentielle Fit (Global Fit) und die SVD-Analyse (Singular Value Decomposition).

### 4.1.2.1 Global Fit

Bei der Photozyklusanalyse im Millisekundenzeitbereich hat sich gezeigt, dass die Prozesse im bR sequentiell und hochsynchronisiert ablaufen und dass sie durch eine globale Analyse mit einer Summe von Exponentialfunktionen erfolgreich beschrieben werden. Für die Primärreaktion, die in den Photozyklus führt, wird das einfache Modell  $A \xrightarrow{k_A} B \xrightarrow{k_B} C$  angenommen. Zu diesem Modell gehört eine Differentialgleichung erster Ordnung, deren Lösung die biexponentielle Fitfunktion der Absorptionsänderungen  $\Delta A(\tilde{\nu}_i, t)$  darstellt:

$$\Delta A(\tilde{\nu}_i, t) = a_A(\tilde{\nu}_i) \exp(-k_A t) + a_B(\tilde{\nu}_i) \exp(-k_B t) + a_0(\tilde{\nu}_i) \quad (4.8)$$

Die Global Fit-Analyse passt simultan über einen breiten Spektralbereich an den spektralen Stützstellen  $i$  die Absorptionsänderungen  $\Delta A(\tilde{\nu}_i, t)$  in Form der Funktion (4.8) an. Dabei wird in einem iterativen Prozess eine Größe  $F$  minimiert, die gemäß

$$F = \sum_i^n \sum_j^m \left[ \left( \sum_p^r a_p(\tilde{\nu}_i) \exp(-k_p t_j) + a_0(\tilde{\nu}_i) \right) - \Delta A_{\text{exp}}(\tilde{\nu}_i, t_j) \right]^2 \quad (4.9)$$

definiert ist. Sie besteht aus der Differenz zwischen dem Wert aus dem biexponentiellen Fit und der gemessenen Absorptionsänderung  $\Delta A_{\text{exp}}$  am Zeitpunkt  $t_j$  für die Wellenzahl  $\tilde{\nu}_i$ . Es werden  $m$  Zeitpunkte und  $n$  Wellenzahlen angepasst. Die Größe  $a_p(\tilde{\nu})$  repräsentiert das Amplitudenspektrum zur Rate  $k_p$ . Es gibt so viele Raten  $k$  wie die Anzahl  $r$  der Intermediate. Die Vorteile eines Global Fits sind der kleinere Fehler für die errechneten Zeitkonstanten gegenüber den Zeitkonstanten aus einem Einzelfit der Transienten und die spektrale

Separierung der überlappenden Produktbanden durch die Amplitudenspektren. Die Amplitudenspektren sind als die Spektren der Spezies A, B und C zu verstehen, die mit den Zeitkonstanten  $\tau_A$  und  $\tau_B$  ineinander übergehen. Negative Amplituden entsprechen im Spektrum einer Zunahme der Absorption, positive einer Abnahme.

#### 4.1.2.2 SVD-Analyse

Für die Analyse der Messdaten ist es notwendig überlagernde Prozesse spektral und zeitlich voneinander zu trennen. Ein Messdatensatz besteht aus Transienten mit  $m$  Zeitpunkten an  $n$  Wellenzahlen. Diese Daten werden in einer  $m \times n$  Matrix  $\mathbf{A}$  zusammengefasst, in deren Spalten die Zeitspur für die jeweilige Wellenzahl steht (jede Zeile stellt ein Spektrum zu einer bestimmten Zeit dar). Diese Matrix besteht z.B. für den analysierten Datensatz in Kapitel 4.7.2.1 aus 70 transienten Spektren mit 50 Wellenzahlen.

Im Global Fit wird neben den Zeitkonstanten des exponentiellen Fits für jede Wellenzahl die entsprechende Amplitude angepasst. Die Anzahl der freien Parameter, die gefittet werden müssen, besteht bei einem biexponentiellen Fit pro Transiente aus drei Amplituden. Als Ergebnis erhält man einen kleinen Parametersatz, der zu jeder Zeitkonstante ein Amplitudenspektrum beinhaltet.

Die SVD-Analyse geht anders vor. Sie ist keine Fitroutine, sondern sucht nach zeitlichen Korrelationen von spektralen Komponenten und trennt damit wie ein Filter Signale vom Rauschen. Das Ergebnis sind signifikante globale Zeitverläufe, die dann mit einer Fitfunktion ausgewertet werden können. In den vorliegenden Anwendungen der SVD-Analyse werden die berechneten Zeitspuren mit einer Summe von Exponentialfunktionen gefittet. Die Ergebnisse von Global Fit und SVD-Analyse sind jeweils Zeitkonstanten mit korrelierten Spektren, die einen Vergleich der beiden Methoden ermöglichen.

Bei der SVD-Analyse [Hen1992] kann die Beschreibung des experimentellen Datensatzes auf einen kleinen signifikanten Parametersatz reduziert werden. Die rechteckige  $m \times n$  Datenmatrix  $\mathbf{A}$  ( $m \geq n$ ) kann als Produkt der drei Matrizen  $\mathbf{U}$ ,  $\mathbf{V}$  und  $\mathbf{S}$  dargestellt werden:

$$\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T \quad (4.10)$$

wobei  $\mathbf{U}$  eine  $m \times n$ ,  $\mathbf{V}$  eine  $m \times n$  und  $\mathbf{S}$  eine  $n \times n$  Diagonalmatrix ist.

Die SVD-Analyse zerlegt  $\mathbf{A}$  in zwei orthogonale Matrizen  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{V}^T$  und die Diagonalmatrix  $\mathbf{S}$ . Wenn  $n$  der Rang von  $\mathbf{A}$  ist, enthält  $\mathbf{S}$  auf der Diagonalen genau  $n$  singuläre Werte, die ungleich null sind. Die Diagonalelemente der Matrix  $\mathbf{S}$  werden singuläre Werte von  $\mathbf{A}$  genannt und werden mit  $s_n$  bezeichnet. Sie werden der Größe geordnet. Die Summe von  $s_n$  ergibt 1. Die Spalten von  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{V}$  sind die rechten und die linken singulären Vektoren von  $\mathbf{A}$ . Der entscheidende Schritt ist, dass die Signale (große Werte für  $s_n$ ) vom Rauschen (kleine Werte für  $s_n$ ) getrennt werden. Auf die vorliegenden Datensätze übertragen bedeutet dies,

dass  $\mathbf{U}$  einen Satz Spektren enthält, die die entsprechenden Transienten in  $\mathbf{V}$  besitzen, mit der durch  $s_n$  gegebenen Signifikanz.

Durch die Gewichtung der Signale mit  $s_n$  erhält man mit der SVD-Analyse eine Reduktion der Parameter. Für die Beschreibung der Daten sind nur die Spektren mit der entsprechenden Zeitspur nötig, zu denen die größten singulären Werte gehören. Bei den hier vorliegenden Datensätzen hat sich ergeben, dass nur die ersten beiden singulären Werte eine deutliche Signifikanz besitzen und die anderen vernachlässigbar klein sind. Somit lässt sich aus zwei Spektren, zwei Kinetiken und den beiden singulären Werten der entsprechende rauschfreie Datensatz zusammensetzen. Im Unterschied zum Global Fit ist der anschließende Fitprozess wesentlich vereinfacht, da nur noch zwei einzelne Kinetiken angepasst werden müssen.

Die Methode hat allerdings den Nachteil, dass aufgrund der Reduktion auf einen kleinen Parametersatz ein Teil der Daten verworfen, und damit bei dem Fitprozess nicht berücksichtigt wird.

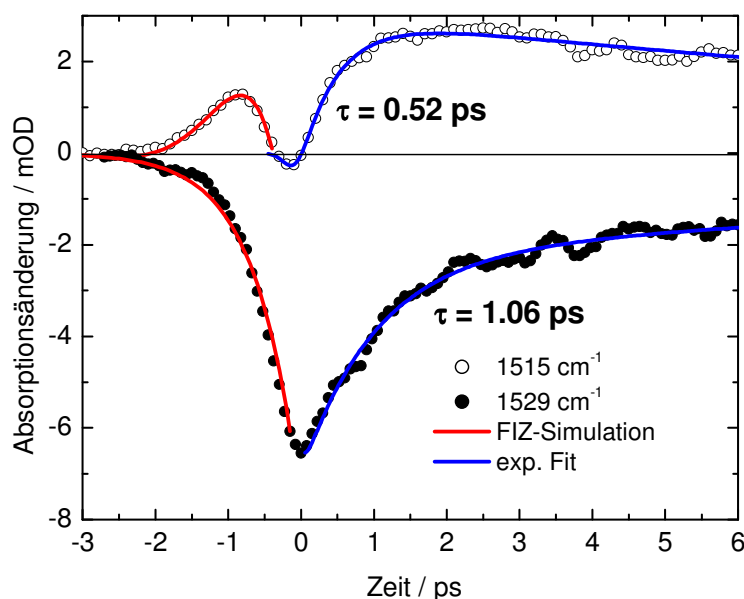
Global Fit und SVD-Analyse sind zwei grundlegend unterschiedliche Methoden: Der Global Fit braucht eine Fitfunktion als Grundlage, die SVD-Analyse ist modellunabhängig und wirkt wie ein Filter, der das Rauschen von den Daten separiert. Die Ergebnisse der SVD-Analyse können helfen die Fitfunktion des Global Fits aufzustellen. Durch die Anzahl der Spektren bekommt man einen Hinweis auf die Anzahl der Spezies und ihre Dynamik.



## 4.2 Entstehung des ersten Photozyklusprodukts

Im Spektralbereich zwischen  $1460$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  absorbieren die in-Phase schwingenden C=C-Streckschwingungen der Polyenkette des Retinalchromophors (Abbildung 1.6). An der zeitlichen Entwicklung dieser Absorptionsbanden zeigt sich durch ihre charakteristische Lage im IR-Spektrum welches Photoprodukt vorliegt. Die Korrelation zwischen dem Absorptionsmaximum im sichtbaren Spektralbereich und der Absorption der C=C-Streckschwingung der Photoprodukte im IR nach Rimai et al. [Rim1973] ordnet der K-Bande eine rotverschobene C=C-Streckschwingung bei  $1519\text{ cm}^{-1}$  zu.

Durch das gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis und durch die  $200\text{ fs}$ -Systemantwort werden die Photoproduktabsorptionsbanden vom J- und K-Zustand, gegenüber früheren Messungen [Dil1998; Dzi1996] spektral und zeitlich deutlich aufgelöst. Die Differenzspektren werden von der Bleichbande (negative Absorptionsdifferenzbande) bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  und der Produktbande bei  $1515\text{ cm}^{-1}$  dominiert. Die Überlagerung verschiedener Prozesse macht die Analyse mit Global Fit und SVD notwendig.



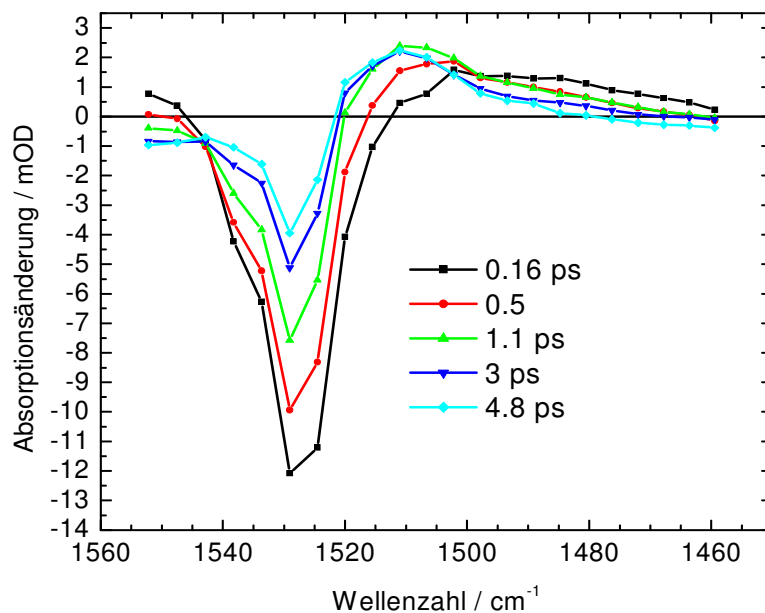
**Abbildung 4.4:**

Die Transiente bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  (unten) zeigt den partiellen Rückgang in den  $\text{BR}_{570}$ -Grundzustand. Die Dynamik bei  $1515\text{ cm}^{-1}$  (oben) ist charakteristisch für die Entstehung des ersten Photozyklusprodukts J. Bei negativen Verzögerungszeiten ist die Simulation (rot) des FIZ (Freier Induktionszerfall) über die Messdaten gelegt. Die Zeitkonstanten stammen aus dem exponentiellen Fit (blau), bei dem die Systemantwort durch Entfaltung berücksichtigt wird.

## 4.2.1 Spektralbereich der C=C-Streckschwingung

Aus dem Messdatensatz im Ethylen(C=C)-Streckschwingungsbereich wurden für die Abbildung 4.4 zwei charakteristische Transienten ausgewählt, um die Produkt- und Eduktdynamik zu zeigen. Eine Übersicht über die transienten Differenzspektren gibt Abbildung 4.5. Bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  wird zu positiven Verzögerungszeiten der Rückgang des Bleichsignals (Eduktdynamik) mit einer Zeitkonstante von  $1,1\text{ ps}$  beobachtet. Das Bleichsignal geht zurück, weil ein Teil der Moleküle in den Grundzustand  $\text{BR}_{570}$  zurückkehrt ohne den Photozyklus zu durchlaufen. Bei negativen Verzögerungszeiten zeigt die Transiente den durch  $T_2$ -Effekte verlängerten Anstieg des negativen Signals. Da  $1529\text{ cm}^{-1}$  die Mittenwellenzahl der Absorptionsbande ist, liegt ein monoexponentieller Verlauf vor. Die Anstiegszeit wird durch die Breite der Bande bestimmt, die eine typische Breite von ca.  $16\text{ cm}^{-1}$  besitzt, das entspricht einer  $T_2$ -Zeit von  $0,62\text{ ps}$  nach:

$$T_2 = \frac{1}{\pi\Delta\nu} = \frac{1}{100\pi \cdot \Delta\tilde{\nu} \cdot c} \quad (4.11)$$



**Abbildung 4.5:**

Transiente Spektren im C=C-Streckschwingungsbereich: Bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  ist die Mittenfrequenz der Bleichbande; das Maximum der Produktbande schiebt in der Zeit von  $5\text{ ps}$  von niedrigen zu höheren Wellenzahlen. Die Entstehung der Bande um  $1490\text{ cm}^{-1}$  bei  $0,16\text{ ps}$  wird nicht zeitaufgelöst. Nach ca.  $5\text{ ps}$  bleiben die Amplitudenverhältnisse konstant.

Die  $T_2$ -Effekte treten ausschließlich bei negativen Verzögerungszeiten  $t_D$ , um den Zeitnullpunkt herum auf. In dem Zeitbereich  $+150\text{ fs}$  (positive Verzögerungszeit) sind die negativen wie positiven Signale in der spektralen Umgebung der Absorptionsbande mit den

$T_2$ -Effekten und der Systemantwort gefaltet. Bei längeren Verzögerungszeiten ( $t_D > +150$  fs) sind sie abgeklungen und haben auf die Absorptionsdifferenzen keinen Einfluss mehr. Deshalb werden für eine Messwertanalyse der Transienten, die eine langsame Dynamik zeigen, die ersten +150 fs nicht betrachtet. Bei einzelnen Absorptionsbanden, die sich mit einer schnellen Zeitkonstante ( $\sim 500$  fs) entwickeln, wird beim exponentiellen Fit mit der entsprechenden Systemantwort (Kapitel 3.3.2) entfaltet. Die Systemantwort beträgt ca. 200 bis 250 fs und ist damit ausreichend kurz, um Prozesse mit  $\tau = 0,5$  ps aufzulösen. Bei den Datenanalysen durch Global Fit oder SVD-Analyse sind die Einflüsse von Systemantwort und  $T_2$ -Effekt vernachlässigbar, da nur Verzögerungszeiten ab +150 fs berücksichtigt werden.

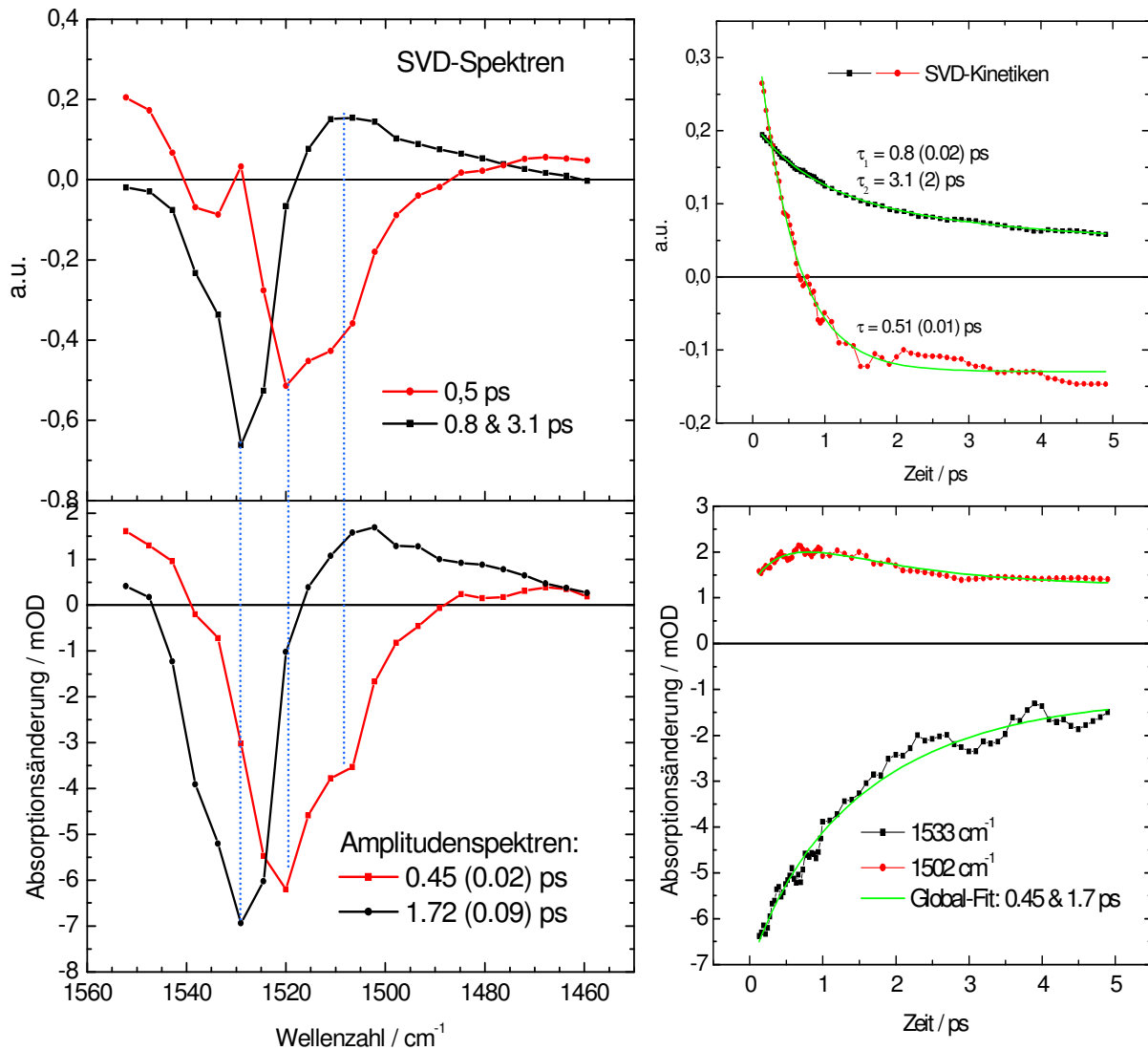
Eine neue, photoinduzierte Schwingungsbande (Produktbande, positive Absorptionsdifferenz) kann zu negativen Verzögerungszeiten noch nicht mit dem Abtastpuls wechselwirken und verursacht deshalb keine  $T_2$ -Effekte. In der Abbildung 4.4 ist das positive Differenzsignal bei  $1515\text{ cm}^{-1}$  dargestellt, also weit entfernt von der Mittenfrequenz der  $1529\text{ cm}^{-1}$ -Grundzustandsbande, die für den  $T_2$ -Effekt verantwortlich ist. Man erkennt deutlich das oszillatorische Verhalten bei negativen Verzögerungszeiten, das am Zeitnullpunkt nur noch gering ist. Für die Bestimmung der Zeitkonstante für den positiven Signalanstieg wird mit der Systemantwort gefaltet und exponentiell gefittet.

Man erhält aus dem exponentiellen Fit der  $1515\text{ cm}^{-1}$ -Transiente für den Anstieg der C=C-Streckschwingungsbande des ersten Photozyklusprodukts eine Zeitkonstante von 0,52 ps. Daraus ergibt sich die neue Erkenntnis, dass die Produktentstehung deutlich schneller verläuft als der Rückgang in den Grundzustand.

Bei der Analyse der Transienten im Bereich der Bleichbande ( $1524$  bis  $1538\text{ cm}^{-1}$ ) mit monoexponentiellen Fits lässt sich die Tendenz feststellen, dass die Zeitkonstanten von 0,8 bis 2 ps mit der Wellenzahl ansteigen. Dies wird als Anzeichen dafür gewertet, dass ein simultaner Prozess dem Rückgang systematisch überlagert ist. In dem Spektrum (Abbildung 4.5) schiebt sich die positive Bande von  $1502\text{ cm}^{-1}$  bei 0,2 ps zu  $1515\text{ cm}^{-1}$  bei 4,8 ps systematisch in die "rote" Flanke der Bleichbande. Daraus lässt sich auf eine spektrale und zeitliche Überlagerung von drei Prozessen schließen: Rückgang des Bleichsignals, Entstehung der Produktethylenbande und die Verschiebung der Produktethylenbande.

#### 4.2.1.1 Auswertung mit Global Fit und SVD-Analyse

Um das Zeitverhalten und die Absorptionsbanden der Prozesse in dem Datensatz von Abbildung 4.5 trennen zu können, wird ein Global Fit und eine SVD-Analyse durchgeführt. Die Transienten aus dem Spektralbereich zwischen  $1460$  und  $1550\text{ cm}^{-1}$  von 0,15 bis 5 ps werden global biexponentiell gefittet. Das Ergebnis sind die Zeitkonstanten 0,45 und 1,7 ps (Abbildung 4.6). Ein anderer Global Fit kann ausgeschlossen werden, da ein



**Abbildung 4.6:**

SVD (oben) (zwei signifikante singuläre Werte:  $s_1(0,8 \text{ \& } 3,1 \text{ ps}) = 9 \%$  und  $s_2(0,5 \text{ ps}) = 2 \%$ ) und Global Fit (unten) des C=C-Streckschwingungsbereichs: Beide Methoden finden zwei Zeitkonstanten. Die Übereinstimmung zwischen dem Amplitudenspektrum und dem SVD-Spektrum sowohl bei der kürzeren als auch bei der längeren Zeitkonstante zeigt, dass die jeweilige Zeitkonstante den gleichen Prozess beschreibt. Das 0,45 ps- und das 0,5 ps-Spektrum zeigt die spektrale Zuordnung der Produktentstehung von J ( $1506 \text{ cm}^{-1}$ ) und K ( $1519 \text{ cm}^{-1}$ ). Mit dem 1,72 ps-Spektrum und dem "0,8 & 3,1 ps"-Spektrum wird die Bleichbandendynamik bei  $1529 \text{ cm}^{-1}$  und der J-Zerfall bei  $1506 \text{ cm}^{-1}$  beschrieben.

monoexponentieller Global Fit die Transienten wie z.B. bei  $1511 \text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4.8) nicht beschreiben kann. Zudem wird mit einer Summe aus drei Exponentialfunktionen keine zusätzliche Zeitkonstante gefunden, die gegenüber den anderen Zeitkonstanten eine vergleichbare Signifikanz besitzt.

Die SVD-Analyse findet zwei Spektren mit hoher Signifikanz (10 und 2 %) und mit jeweils einer systematischen Kinetik (Abbildung 4.6). Alle anderen Spektren aus der Spektren-Matrix besitzen eine Signifikanz  $< 0,4 \%$  und zeigen in den entsprechenden Kinetiken Rauschen. Die Zeitkonstanten der Zeitspuren zu den signifikanten Spektren werden mit

einem exponentiellen Fit bestimmt. Man erhält für das Spektrum mit 2 % Signifikanz eine schnelle Zeitkonstante von 0,5 ps und für das Spektrum mit 10 % Signifikanz das biexponentielle Verhalten mit 0,8 und 3,1 ps.

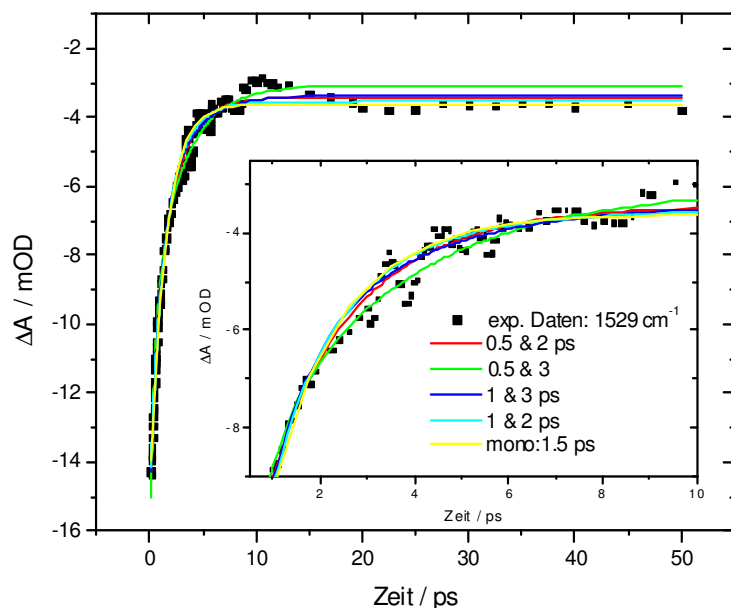
Zu jeder Zeitkonstanten aus dem Global Fit erhält man ein Amplitudenspektrum. Das 1,7 ps-Amplitudenspektrum besitzt sein Maximum bei  $1511\text{ cm}^{-1}$ , das 0,5 ps-Amplitudenspektrum sein Minimum bei  $1519\text{ cm}^{-1}$  mit einer Schulter bei  $1511\text{ cm}^{-1}$ . Wie schon erwähnt bedeuteten die negativen Amplituden bei  $1511$  und  $1519\text{ cm}^{-1}$ , dass dort photoinduzierte Absorptionsbanden entstehen. Schaut man zum Vergleich die SVD-Spektren an, stellt man bei den oben beschriebenen Wellenzahlen ein gleiches spektrales Muster fest. Auch in der kinetischen Auswertung findet man in Zeit und Anzahl der beteiligten Zeitkonstanten eine gute Übereinstimmung zwischen SVD-Analyse und Global Fit. Die beiden Analysemethoden bestätigen sich gegenseitig ihre Ergebnisse.

Für die Absorptionsbande bei  $1519\text{ cm}^{-1}$  gibt es im Spektrum die Bandenzuordnung aus den Raman- und FTIR-Untersuchungen [Bra1982], dass bei dieser Wellenzahl die C=C-Streckschwingung des K-Intermediats absorbiert. Die gegenüber der K-Bande rotverschobene Absorptionsbande zu frühen Zeiten ( $t_D < 1\text{ps}$ ) wird dem J-Zustand zugeordnet. Demnach sind beide Amplitudenspektren so zu interpretieren, dass bei  $1511\text{ cm}^{-1}$  die charakteristische J-Bande mit 0,5 ps entsteht und mit 1,7 ps nach K zerfällt (positive Komponente im 1,7 ps-Spektrum). Die Amplitude der Mittenwellenzahl der K-Bande bei  $1519\text{ cm}^{-1}$  steigt ebenfalls mit 0,5 ps an. Ein Anstieg mit der Zeit des J-Zerfalls kann nicht separiert werden.

Das Minimum und die spektrale Form des 1,7 ps-Amplitudenspektrums stimmen mit der Form und dem Zentrum der C=C-Streckschwingungsbande des BR<sub>570</sub> deutlich überein. Der Rückgang der Bleichbande verläuft sichtbar langsamer als die Produktentstehung. In der "roten" Flanke liegt durch die Überlagerung mit der J-Entstehung biexponentielles Verhalten vor. Mit der spektralen Überlappung der Amplitudenspektren ist das unterschiedliche Zeitverhalten innerhalb der  $1529\text{ cm}^{-1}$ -Bande zu erklären.

Die Entstehung der Produktbande wird eindeutig mit 0,5 ps bestimmt. Aus den Experimenten im sichtbaren Spektralbereich ist die Zerfallszeit von 0,5 ps für den S<sub>1</sub>-Zustand (Abbildung 1.3) bekannt. Damit wird klar, dass die Produktentstehung (J-Bande) simultan mit dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustands verläuft.

Die Zeitkonstante für den Zerfall des J-Zustands ist mit einem größeren Fehler als 90 fs behaftet, der sich aus der Messwertanalyse in Abbildung 4.6 ergeben hat. Mit verschiedenen Messungen wurde die 0,5 ps-Zeitkonstante und das biexponentielle Verhalten gut reproduziert. Bei der langsameren Zeitkonstante variieren allerdings die biexponentiellen Fits zwischen 1,5 und 3 ps.

**Abbildung 4.7:**

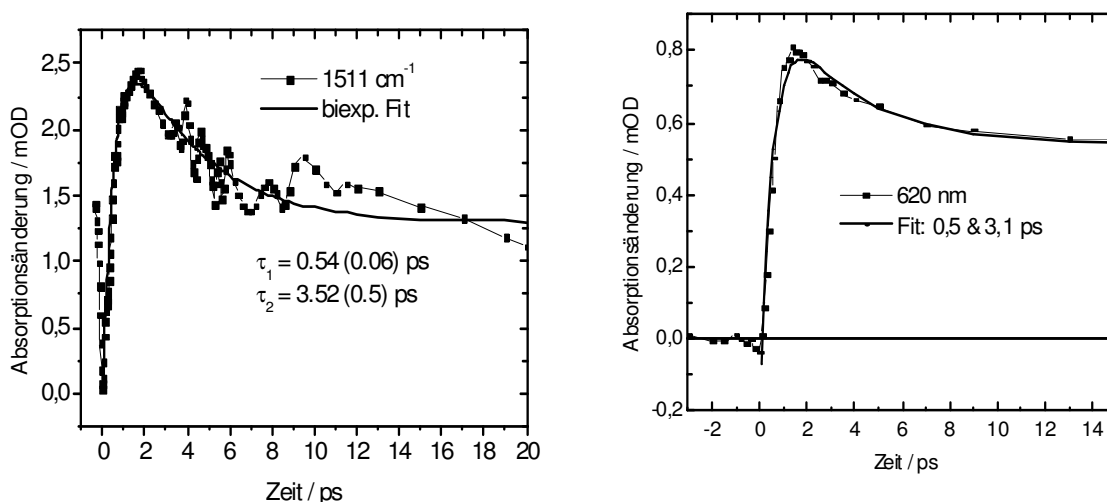
Die Messdaten bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  lassen keine Unterscheidung zu, ob der Rückgang des Bleichsignals mono- oder biexponentiell verläuft. Es wird ein 1,5 ps-Fit mit verschiedenen biexponentiellen Fits verglichen. (Die ersten 10 ps werden im Ausschnitt gezeigt.)

In der Abbildung 4.7 werden für die Kinetik bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  mono- und biexponentielle Fits verglichen. Es zeigt sich, dass die Transiente im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses mit 0,5 und 3 ps oder mit dem monoexponentiellen Fit mit einer 1,5 ps-Zeitkonstante jeweils gleich gut beschrieben werden kann. Es lässt sich im Rahmen des vorliegenden Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht eindeutig beantworten, ob der Rückgang des Bleichsignals außerhalb der spektralen Überlagerung mit der Produktbande mono- oder biexponentiell verläuft. Die SVD-Transiente (Abbildung 4.6) mit dem biexponentiellen Verhalten ist ein Hinweis auf einen biphasischen Rückgang des Bleichsignals.

Eine Bestätigung, dass die Transienten um  $1511\text{ cm}^{-1}$  die Produktdynamik zeigen, bekommt man aus dem Vergleich mit der Dynamik der Absorptionsdifferenzen bei 620 nm (Abbildung 4.8), wo die elektronische Absorption des J-Zustands liegt.

Da die Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der sichtbaren Spektroskopie gezeigt werden konnte, kann nun das Reaktionsmodell aus der Abbildung 1.3 übertragen werden. Demnach geht mit dem Zerfall des  $S_1$ -Zustands auch die Reaktionsverzweigung einher. Durch den Anregungspuls wird ein Teil der Moleküle aus dem elektronischen Grundzustand  $BR_{570}$  entfernt, was durch die negativen Differenzbanden widergespiegelt wird. Gemäß der Quantenausbeute [Log1997; Sch1989; Tit1990] durchlaufen nur 64 % der angeregten Moleküle den Photozyklus; der andere Teil (36%) reagiert nicht und geht vom  $S_1$ -Zustand direkt nach  $BR_{570}$  zurück. Demnach wäre zu erwarten, dass nach 12 ps 64 % von der negativen 0 ps-Absorptionsdifferenz verbleiben. Das Verhältnis der Absorptionssignale  $\Delta A(0\text{ ps}) / \Delta A(12\text{ ps})$  bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  liegt dagegen bei ungefähr 30 % und nicht bei 64 %. Als möglicher Grund hierfür wird angenommen, dass ein positives Signal das negative Signal

verringert. Wie sich die Ergebnisse in das Modell integrieren lassen wird in Kapitel 5 diskutiert.



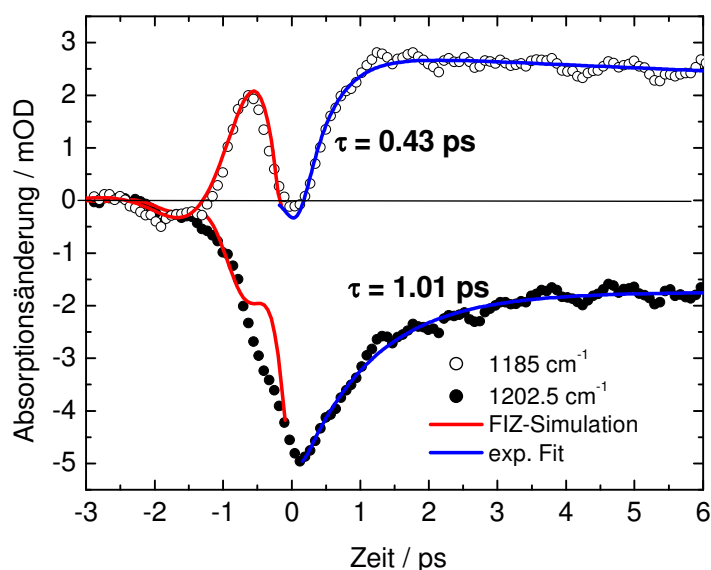
**Abbildung 4.8:**

Vergleich der Produktdynamik: Im infraroten sowie im sichtbaren Spektralbereich wird die gleiche Dynamik bei den charakteristischen Markerbanden für das J-Intermediat gefunden. Links: Nach der Korrelation von van den Berg et al. [Ber1990] wird die C=C-Streckschwingungsbande des J-Zustands bei  $1510\text{ cm}^{-1}$  liegen. Die 0,5 ps beschreiben die Entstehung des Produkts, die 3,5 ps den Zerfall. Rechts: Die Absorptionsbandendynamik vom J-Zustand im sichtbaren Spektralbereich bei  $620\text{ nm}$  verläuft ähnlich wie die  $1511\text{ cm}^{-1}$ -Dynamik.

Die Lage und die Dynamik der Ethylenbanden sind wichtige Kriterien für die Intermediatzuordnungen und dienen als Basis für den Vergleich mit den fs-Messungen im sichtbaren Spektralbereich. So konnte erfolgreich der Photozyklusbeginn, wie er auf der Grundlage der elektronischen Übergänge entwickelt worden ist, an den C=C-Streckschwingungen bestätigt werden. Aber die Frage in welchem Isomerisierungszustand sich das Produkt befindet, lässt sich an den C=C-Streckschwingungen nicht ablesen. Dafür müssen die Absorptionsdifferenzsignale der C-C-Streckschwingungen untersucht werden.

## 4.3 Entstehung der 13-cis-Konfiguration

Die Messergebnisse aus dem Fingerprint-Bereich zwischen  $1160$  und  $1260\text{ cm}^{-1}$  mit einer Wellenzahlaufösung von  $3\text{ cm}^{-1}$  und mit einer Zeitaufösung von  $250$  bis  $300\text{ fs}$  bilden die wichtigsten Resultate der vorliegenden Arbeit. Denn in diesem Spektralbereich kann anhand der C-C-Streckschwingungen des Chromophors die Isomerisierung von der all-trans- nach 13-cis-Konfiguration beobachtet werden. So erhält man erstmals klare Erkenntnisse über die strukturelle Dynamik der Isomerisierung auf molekularer Ebene.



**Abbildung 4.9:**

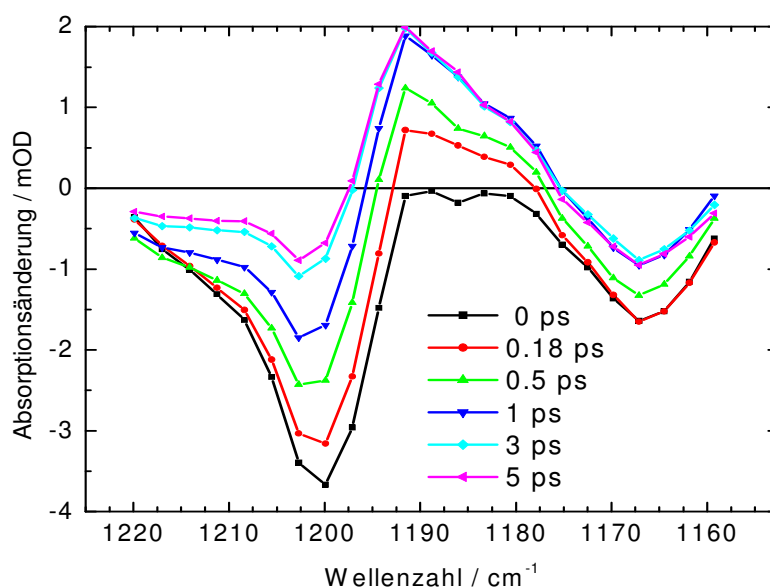
Transiente Absorptionssignale der  $C_{14}$ - $C_{15}$ -Streckschwingung der all-trans-Konfiguration bei  $1202,5\text{ cm}^{-1}$  (negativ) und der 13-cis-Konfiguration bei  $1185\text{ cm}^{-1}$  (positiv). Bei negativen Verzögerungszeiten ist die Simulation (rot) des FIZ (Freier Induktionszerfall) über die Messdaten gelegt. Die Zeitkonstanten stammen aus dem exponentiellen Fit (blau), bei dem die Systemantwort durch Entfaltung berücksichtigt wird.

### 4.3.1 Spektralbereich der C-C-Streckschwingung

Wie schon in der Tabelle 1.2 im Kapitel 1.1.1.2 aufgeführt wurde, absorbieren im Fingerprint-Bereich die charakteristischen  $C_{14}$ - $C_{15}$ - und  $C_{10}$ - $C_{11}$ -Streckschwingungsbanden der all-trans-Konfiguration bei  $1200$  und  $1170\text{ cm}^{-1}$  [Smi1987]. In der 13-cis-Konfiguration verschiebt die  $C_{14}$ - $C_{15}$ -Streckschwingung zu  $1194\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 1.6 und 4.10). Anhand der Transienten in der Abbildung 4.9 lässt sich der partielle Rückgang des Bleichsignals und das Entstehen der 13-cis-Bande klar verfolgen. Auch hier prägen bei negativen Verzögerungszeiten die  $T_2$ -Effekte das Differenzsignal. Das  $T_2$ -Verhalten ist diesmal eine Superposition aus den  $T_2$ -Effekten der Grundzustandsbanden bei  $1200$  und  $1170\text{ cm}^{-1}$ . Für die Analyse werden die Daten auch hier um den Zeitnullpunkt herum mit der Systemantwort entfaltet und exponentiell gefittet. Der Rückgang des Bleichsignals hat bei  $1200\text{ cm}^{-1}$  eine



Zeitkonstante von 1 ps. Aus dem breiten positiven Signal ist in der Abbildung 4.9 repräsentativ für die 13-cis-Bande die Kinetik bei  $1185\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Die positive Absorptionsveränderung steigt mit  $0,43\text{ ps}$  an. Diese Zeit ist konsistent mit der Entstehungszeit der C=C-Streckschwingungsbande des J-Zustands bei  $1515\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4.4).



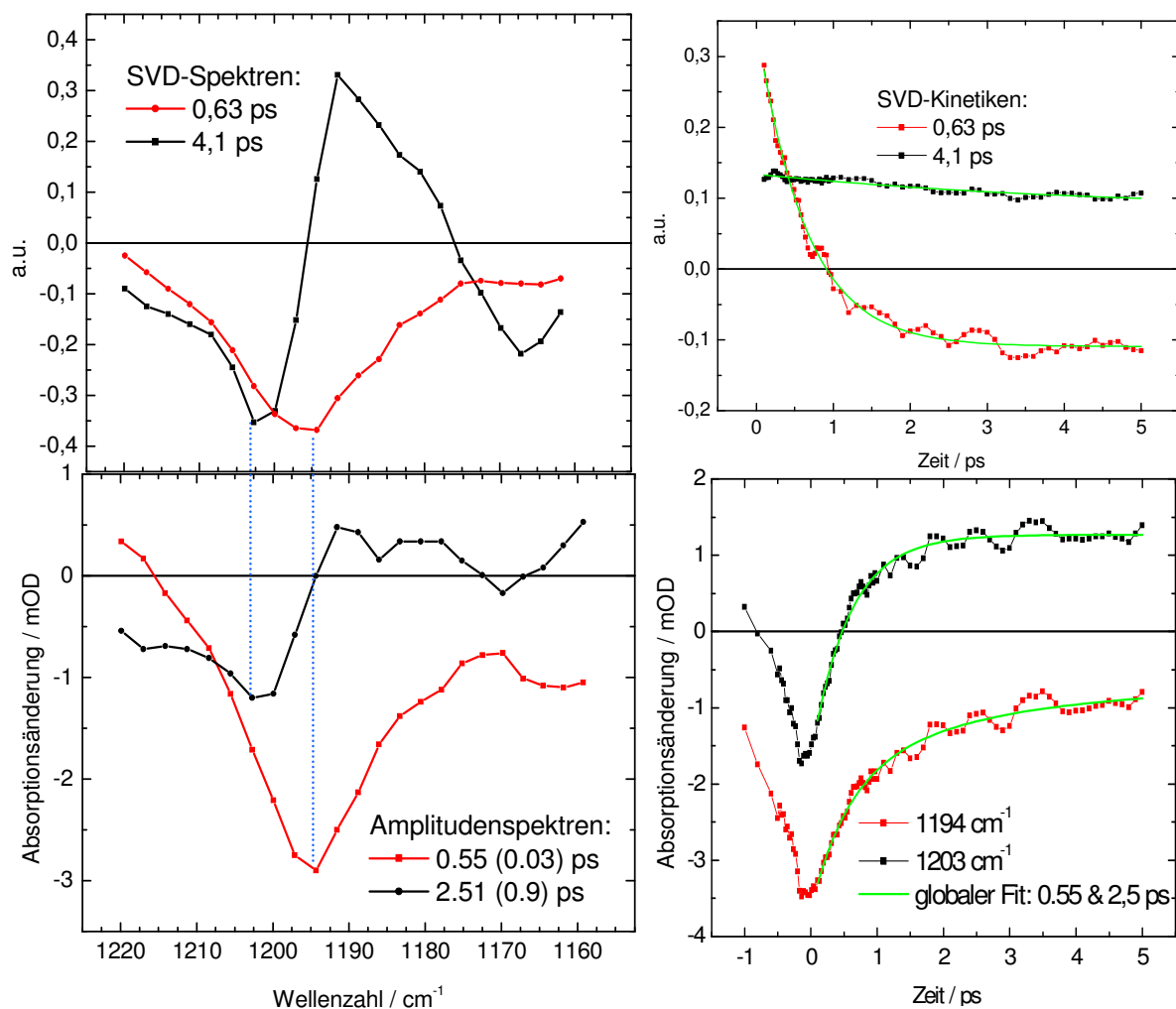
**Abbildung 4.10:**

Transiente Spektren des Fingerprint-Bereichs ( $1160$  bis  $1220\text{ cm}^{-1}$ ). Die zwei dominanten C-C-Streckschwingungen der all-trans-Konfiguration (negative Banden bei  $1202$  und  $1170\text{ cm}^{-1}$ ) und die positive 13-cis-Bande bei  $1194\text{ cm}^{-1}$  bilden das typische Fingerprint-Muster. Nach  $1\text{ ps}$  zeigt die  $1194\text{ cm}^{-1}$ -Bande nur eine geringe Veränderung der Amplitude.

Sowohl in der Kinetik (Abbildung 4.9) als auch im Spektrum (Abbildung 4.10) sind die Entwicklungen der 13-cis- und all-trans-Banden gut zu verfolgen. Es wird festgestellt, dass der Rückgang des Bleichsignals mit  $\sim 1\text{ ps}$  deutlich langsamer ist als die Produktentstehung mit  $0,43\text{ ps}$ .

### 4.3.1.1 Auswertung mit Global Fit und SVD-Analyse

Die positiven und negativen Banden überlappen spektral, da sie bei einer Breite von  $\sim 15\text{ cm}^{-1}$  nur  $7\text{ cm}^{-1}$  Abstand haben. Für eine genaue Analyse ist es notwendig, die Banden voneinander zu trennen und für die jeweiligen Prozesse, wie im Ethylenstreckschwingungsbereich, die Dynamik zu bestimmen. Dazu wird der dargestellte Datensatz aus Abbildung 4.10 global biexponentiell zwischen  $0,17$  und  $5\text{ ps}$  analysiert. Die Fitergebnisse sind die globalen Zeitkonstanten  $0,55$  und  $2,5\text{ ps}$  und die damit korrelierenden Amplitudenspektren aus Abbildung 4.11. Das  $0,55\text{ ps}$ -Amplitudenspektrum hat die Form einer separaten Absorptionsbande mit dem Minimum bei  $1194\text{ cm}^{-1}$ . Dieses



**Abbildung 4.11:**

Global Fit und SVD-Analyse des Fingerprint-Bereichs: Der Datensatz umfasst die Transienten zwischen 1160 und 1220  $\text{cm}^{-1}$  von 0,17 bis 5 ps. Oben links: SVD-Analyse berechnet zwei signifikante Spektren ( $s_1(4,1 \text{ ps}) = 4 \%$  und  $s_2(0,63 \text{ ps}) = 2 \%$ ) mit den entsprechenden Kinetiken (oben rechts). Unten links: Die biexponentielle Global Fit-Analyse ergibt zwei Zeitkonstanten: 0,55 und 2,5 ps. Es wird erfolgreich die Produktdynamik von der Eduktdynamik separiert. Das Fitergebnis wird an den Transienten von 1194 und 1203  $\text{cm}^{-1}$  demonstriert (unten rechts).

Amplitudenspektrum zeigt das Entstehen der 13-cis-Konfiguration mit 0,55 ps.

Das Amplitudenspektrum mit der 2,5 ps-Zeitkonstante hat das spektrale Muster des 0,18 ps-Spektrums aus Abbildung 4.10, das für die all-trans-Konfiguration des Chromophors steht.

Hierdurch wird deutlich, dass die 2,5 ps-Dynamik die Rückkehr der nicht isomerisierten Moleküle nach BR<sub>570</sub> widerspiegelt. Beide Amplitudenspektren überlappen in dem Bereich der 1200  $\text{cm}^{-1}$ -Bleichbande, so dass der Rückgang nach BR<sub>570</sub> biexponentiell verläuft. Durch die 2,5 ps-Zeitkonstante wird ein Zerfall einer positiven Bande zwischen 1175 und 1194  $\text{cm}^{-1}$  beschrieben, die rotverschoben zur 1200  $\text{cm}^{-1}$ -Bleichbande liegt. Dieser Zerfall ist mit der Bleichbandendynamik gekoppelt, wie die positive Bande bei 1500  $\text{cm}^{-1}$  im

Ethylenstreckschwingungsbereich, mit der  $1529\text{cm}^{-1}$ -Bleichbandendynamik.

Ein weiterer Vergleich wird mit den Ergebnissen aus der SVD-Analyse des gleichen Datensatzes gemacht. Die SVD-Analyse sucht im Datensatz nach spektralen Zusammenhängen, die das gleiche Zeitverhalten besitzen. Heraus kommt eine Anzahl von Spektren, von denen im Fingerprint-Bereich nur zwei eine Signifikanz besitzen.

Die Spektren mit der größten Gewichtung (9 und 4 %) und den entsprechenden Kinetiken (Abbildung 4.11) zeigen Übereinstimmungen zum biexponentiellen globalen Fitergebnis. Die Zeitkonstanten der SVD-Kinetiken 4 und 0,63 ps werden mit einer monoexponentiellen Fitfunktion bestimmt. Die Ähnlichkeiten zwischen den Amplitudenspektren und den SVD-Spektren sowohl für die kurze als auch für die lange Zeitkonstante sind groß und können die angewandte Global Fitfunktion, die aus einer Summe von zwei Exponentialfunktionen besteht, bestätigen.

Durch den Global Fit und die SVD-Analyse wird für die Produktentstehung übereinstimmend die schnelle Dynamik mit 0,55 ps bestimmt. Die Zeitkonstanten für den Rückgang des Bleichsignals sind allerdings deutlich unterschiedlich (Abbildung 4.11). Beim Vergleich der Amplituden- und SVD-Spektren sieht man, dass die unterschiedlichen Zeitkonstanten die gleichen Prozesse beschreiben, da sie ähnliche spektrale Muster aufweisen. Es ist bemerkenswert, dass in der SVD-Analyse das 4,1 ps-Spektrum die größere Signifikanz besitzt als das 0,63 ps-Spektrum. Die hohe Signifikanz deutet daraufhin, dass das 4,1 ps-Zeitverhalten in jeder Transiente deutlich ausgeprägt ist.

Die Bleichbanden- und Produktbandendynamik der Transienten aus Abbildung 4.9 variieren bei monoexponentiellem Fit einzelner Transienten in der Zeitkonstante nur um 0,5 ps. Das führt sowohl beim Global Fit als auch bei der SVD-Analyse dazu, dass es keine deutliche spektrale Separierung von 13-cis- und all-trans-Banden gibt. Vielmehr deuten die Analysen an, dass die Dynamik im Bleichsignal biexponentiell verläuft und somit mit dem Spektrum der 0,5 ps-Zeitkonstante überlappen muss.

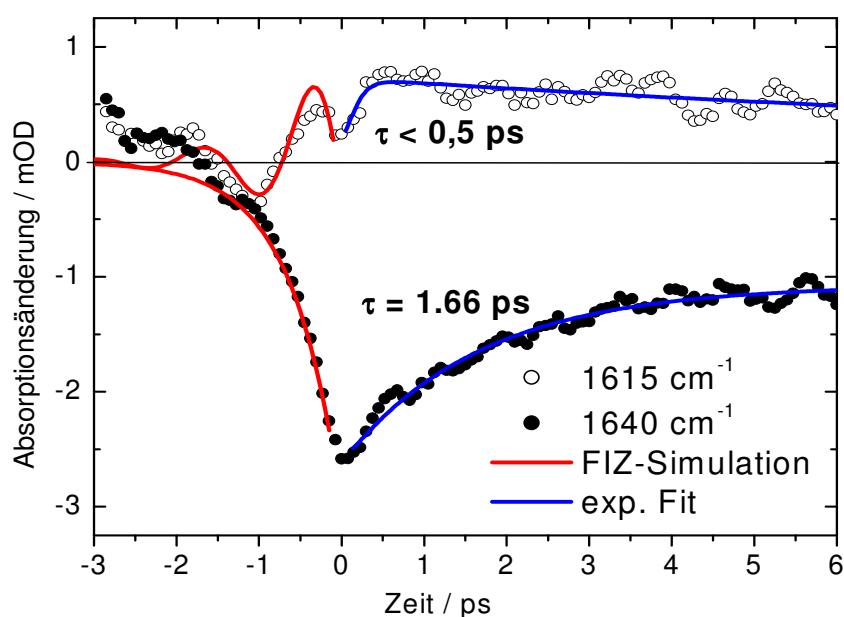
Interessanterweise wird die lange Zeitkonstante sowohl in der Produktbande wie auch in den  $\text{BR}_{570}$ -Banden gefunden. Die Erklärung hierfür findet sich in Kapitel 4.7.2.1; dort wird das spektrale Muster der langsamen Dynamik näher erläutert.

Aus diesem Kapitel ergeben sich drei zentrale Aussagen:

- Die all-trans- nach 13-cis-Isomerisierung läuft simultan zur J-Entstehung und zum Zerfall des elektronisch angeregten Zustands mit 0,5 ps ab.
- Die Isomerisierung findet nicht beim J-K-Übergang statt. Die Vermutung von Atkinson et al. [Atk2000] wird widerlegt.
- Die Rückgänge der Bleichsignale bei  $1200$  und  $1529\text{cm}^{-1}$  verlaufen monoexponentiell mit 1 bis 2 ps oder biexponentiell mit 0,5 und 2 ps.

## 4.4 Veränderte Umgebung der Schiffischen Base (Chromophor-Bindungsstelle)

Der Spektralbereich, in dem die Absorption der C=NH-Streckschwingung dominiert (Abbildung 1.6), reicht von 1600 bis 1650  $\text{cm}^{-1}$ . Die BR<sub>570</sub>-Bande der C=NH-Streckschwingung liegt bei 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Diese Bande kann als Indikator für die Veränderungen in der Umgebung der Schiffischen Base angesehen werden.



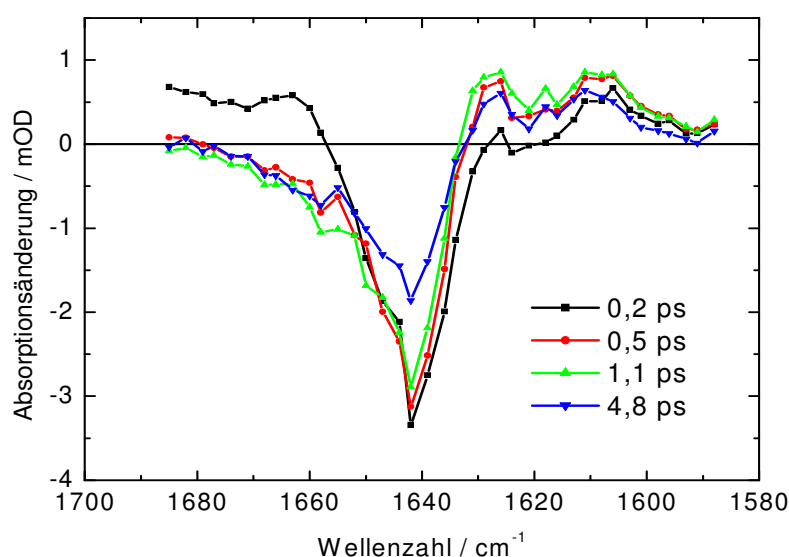
**Abbildung 4.12:**

Transienten im C=NH-Streckschwingungsbereich bei 1615 und 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Die Bleichbande bei 1640  $\text{cm}^{-1}$  zeigt den gegenüber der Entstehung der positiven Bande langsamen partiellen Rückgang mit 1,66 ps. Bei negativen Verzögerungszeiten ist die Simulation (rot) des FIZ (Freier Induktionszerfall) über die Messdaten gelegt. Die Zeitkonstanten stammen aus dem exponentiellen Fit (blau), bei dem die Systemantwort durch Entfaltung berücksichtigt wird.

### 4.4.1 Die Absorption der C=NH-Streckschwingung

Die positive Bande bei 1615  $\text{cm}^{-1}$  in der Abbildung 4.12 entsteht mit  $\sim 0,5 \text{ ps}$ . Die Bleichbande geht exponentiell mit einer Zeitkonstante von 1,66 ps zurück. Es fällt auf, dass trotz der großen spektralen Separation die (positiven) Produktbande eine weitaus kleinere Amplitude haben als die (negative) Eduktbande. Gemäß der Quantenausbeute sollte der Unterschied 36 % betragen. Aber selbst dieser Wert wird im C=NH-Streckschwingungsbereich von einer positiven Bande nicht erreicht. Die 13-cis-C=NH-Streckschwingungsbande ist entweder sehr breit, von geringer Oszillatorstärke, oder koppelt

mit anderen Moden. In jedem Fall ist sie gegenüber der Bleichbande verhältnismäßig klein. Es ist nicht eindeutig geklärt, wohin die 13-cis-C=NH-Streckschwingung verschiebt. Wie die Bleichbanden im C=C- oder C-C-Streckschwingungsbereich geht die Bleichbande bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  langsamer partiell zurück als die Produktentstehung. Da die  $1640\text{ cm}^{-1}$ -Bande von den Überlagerungen anderer Prozesse weniger berührt wird, als die C=C- oder C-C-Streckschwingungsbanden, kann hier die Dynamik der Bleichbande deutlicher beobachtet werden. Man erkennt dies daran, dass die 1,66 ps-Zeitkonstante langsamer ist als die Zeitkonstante der Bleichbanden bei  $1200$  und  $1529\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4.4, Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.13:**

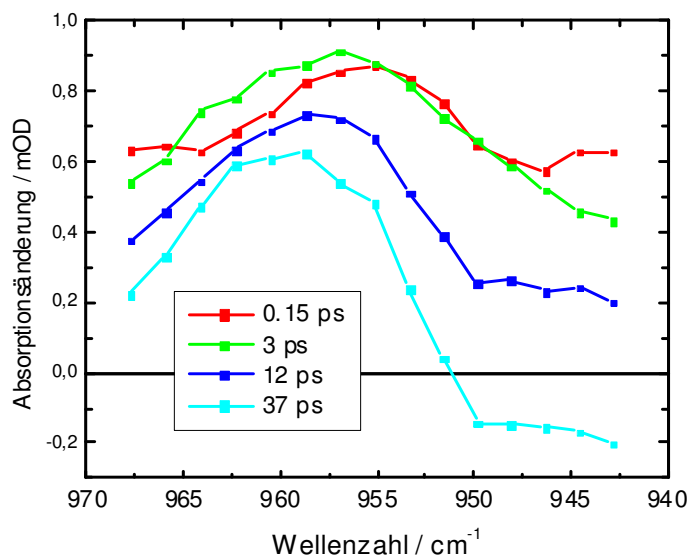
Transiente Spektren im C=NH-Streckschwingungsbereich: Im Bereich um  $1640\text{ cm}^{-1}$  absorbiert die all-trans-C=NH-Streckschwingung. Zwischen  $1600$  und  $1620\text{ cm}^{-1}$  entsteht die 13-cis-C=NH-Streckschwingung. Im Bereich von  $1660\text{ cm}^{-1}$  absorbiert eine Proteinbande.

In den Spektren von Abbildung 4.13 gibt es eine wenig ausgeprägte positive Bandenstruktur zwischen  $1605$  und  $1625\text{ cm}^{-1}$ . Die Entstehung dieser Bandenstruktur geht einher mit der Produkt- und der 13-cis-Bildung. Sie erreicht nach 1 ps ihre maximale Amplitude und sinkt dann geringfügig ab (4,8 ps-Spektrum). Die Absorption um  $1660\text{ cm}^{-1}$  wird nicht dem Chromophor zugeordnet (Kapitel 4.6). In diesem Bereich absorbieren das Peptidgerüst (Amid I), Wasser und Aminosäuren (Abbildung 1.6). Die Spektren aus Diller et al. [Dil1995] weisen eine große Übereinstimmung zu den hier vorgestellten Messungen auf.

Die Isomerisierung führt zu einer Umgebungsänderung der Schiffsbasis. Das Ladungsgleichgewicht zwischen der positiven Ladung der SB und dem diffusen Gegenion, das sich aus geladenen Aminosäuren zusammensetzt, wird gestört. Da die SB empfindlich auf Ladungsverschiebungen reagiert, wirkt sich dies zusätzlich zur Isomerisierung auf die Absorption der C=NH-Streckschwingung aus. Der Rückgang der positiven Signale wird mit dem J-K-Übergang verbunden.

## 4.5 Verdrillung des Chromophors

Resonanz-Raman-Spektren [Doi1991; Bra1982; Loh1991] vom K-Zustand zeigen stark verbreiterte Schwingungsbanden im HOOP-Bereich. HOOP-Moden von planaren Polyenen haben erwartungsgemäß geringe IR-Intensitäten. Bei dem protonierten Schiff Base Retinal in Lösung treten die HOOP-Moden nur sehr schwach auf, da es im Lösungsmittel genügend Freiheitsgrade gibt, um eine planare Konfiguration einzunehmen. Im Protein hingegen muss sich der Chromophor dem Raum der Proteinumgebung anpassen und kann deshalb keine planare Struktur einnehmen. Die Amplituden der HOOP-Schwingungen im BR<sub>570</sub>-Spektrum sind gering; sie werden deutlicher, wenn die Struktur verdreht wird. Im RR-Tieftemperaturspektrum [Bra1982] wird eine prominente Bande bei 957 cm<sup>-1</sup> gemessen, die der C<sub>15</sub>-HOOP-Mode zugeordnet wird.



**Abbildung 4.14:**

HOOP-Bande bei 957 cm<sup>-1</sup>: Die Absorption der HOOP-Banden liegt zwischen 800 und 1000 cm<sup>-1</sup>. Bei 956 cm<sup>-1</sup> wird eine breite Bande gezeigt. Sie ist zwischen 0,15 und 3 ps breiter als der abgebildete Ausschnitt. Ab 12 ps wird sie deutlich schmaler.

### 4.5.1 HOOP-Schwingungen

Im Bereich von 957 cm<sup>-1</sup> wurden Transienten aufgenommen, deren Spektren in Abbildung 4.14 dargestellt sind. Es ist deutlich zu sehen, dass bei 0,15 ps eine, verglichen mit der Zeitauflösung instantane, Absorption vorhanden ist, die dann langsam zerfällt (> 20 ps). Das Spektrum der Bande wird ab 12 ps deutlich schmaler.

In den zeitaufgelösten RR-Spektren gibt es im 0 ps-Spektrum bei Doig et al. [Doi1991] bei 956 und bei 1000 cm<sup>-1</sup> deutliche Schwingungsbanden, deren Intensität nach 1,5 ps wieder zerfallen ist. Im ns-Bereich wird wiederum eine deutliche HOOP-Intensität festgestellt

[Lor1991; Doi1991].

Der Chromophor wird nach der Isomerisierung nicht planar sein. Die entstandene Verdrillung relaxiert, so dass eine mehr planare Konfiguration entsteht. Beim Vergleich von IR- und RR-Tiefstemperaturspektren des K-Zustands erkennt man das gleiche spektrale Muster [Rot1984] im HOOP-Bereich. Die prominenten Banden liegen bei 811 und 957  $\text{cm}^{-1}$ . In der Diskussion zur Isomerisierung werden die HOOP-Banden als Indikatoren für die Torsionsbewegung genommen. Die Argumentation von Atkinson et al. [Atk2000], dass die Isomerisierung im J-K-Übergang stattfindet, stützt sich unter anderem auf den Nachweis des HOOP-Bandenmusters. Es wurden die Bandenstruktur des mit CARS-Spektroskopie aufgenommenen J-Spektrums vom bR-Wildtyp mit dem CARS-Spektrum vom bR5.12<sup>1</sup> verglichen. Aufgrund der festgestellten Analogie wurde von den Autoren geschlossen, dass das J-Spektrum vom bR-Wildtyp keine 13-cis-Struktur zeigt.

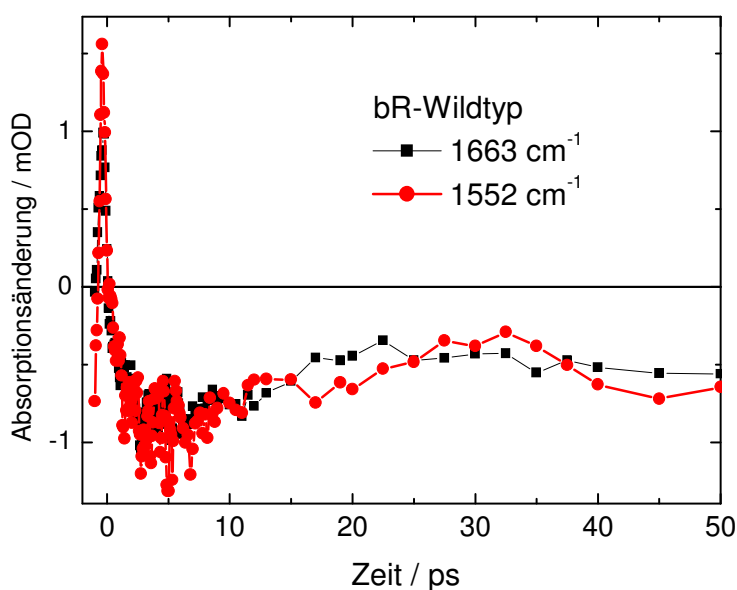
Die hier vorgestellten HOOP-Messungen sind mit einem Fehler von  $\pm 0,2$  mOD bei einer Signalgröße von 0,8 mOD behaftet. Die Messungen sind für eine quantitative Analyse nicht aussagekräftig genug, aber qualitativ lässt sich erkennen, dass die J-Bandenstruktur der K-Bandenstruktur ähnelt. Das bedeutet, dass der Chromophor im J-Zustand und beim J-K-Übergang seine Verdrillung nicht ändert.

---

<sup>1</sup> Die Ergebnisse am Protein bR5.12 mit geblocktem Retinal wird in Kapitel 4.8 erläutert.

## 4.6 Die Absorption bei 1550 und 1660 $\text{cm}^{-1}$

Die sogenannten Amid I- und Amid II-Banden sind Schwingungen des Peptidgerüsts. Die C-N-Streckschwingungen bilden die Amid II-Bande bei  $1550 \text{ cm}^{-1}$  und die C=O-Streckschwingungen bei  $1660 \text{ cm}^{-1}$  die Amid I-Bande (Abbildung 1.6 und 3.11). Die Chromophorbande mit der höchsten Frequenz ist die C=NH-Streckschwingung von BR<sub>570</sub>, die bei  $1640 \text{ cm}^{-1}$  absorbiert [Smi1987]. Bei dem protonierten Schiff Base Retinal in Lösung sind die Chromophorbanden gegenüber denen im bR blauverschoben. Man kann somit abschätzen, wenn im IR-Spektrum des protonierten Schiff Base Retinals in Lösung keine höherfrequente Mode als die C=NH-Streckmode bei  $1654 \text{ cm}^{-1}$  liegt, dann wird im bR bei  $1660 \text{ cm}^{-1}$  keine Chromophormode absorbieren. Die  $1660 \text{ cm}^{-1}$ -Bande ist einer Schwingungsmode aus der Umgebung des Chromophors zuzuordnen. Hierfür kommen die Amid I-Schwingung, die Biegeschwingung von im Protein gebundenem Wasser oder Aminosäuren in Frage.



**Abbildung 4.15:**

Transienten bei  $1552$  und  $1663 \text{ cm}^{-1}$ : Das Zeitverhalten in diesen Transienten unterscheidet sich von allen anderen im Spektrum. In diesen Bereichen absorbieren die Amid I- und Amid II-Banden.

Die beiden Wellenzahlbereiche um  $1550$  und  $1660 \text{ cm}^{-1}$  fallen durch eine besondere Dynamik auf (Abbildung 4.15). In beiden Fällen entsteht verzögert mit einer Zeitkonstante von  $0,5$  bis  $1 \text{ ps}$  eine negative Absorption, die dann mit einer langsameren Zeitkonstante wieder abnimmt. Es ist erstaunlich, dass die Bleichbande verzögert auftritt und nicht wie die anderen Chromophorbanden innerhalb der entsprechenden  $T_2$ -Zeit auftauchen. Es besteht die Möglichkeit, dass eine positive Absorption die negative Absorption aufhebt, denn erst wenn die positive Bande zerfallen ist, kann die negative Bande sichtbar werden. Für diesen



Prozess muss es im Spektrum instantane und positive Schwingungsbanden bei 1550 und 1660  $\text{cm}^{-1}$  geben. Ein Argument für diese Überlagerung im Fall vom 1550  $\text{cm}^{-1}$  ist, dass die negative Absorption in der spektralen Nachbarschaft zur  $S_1$ -Bande liegt (Kapitel 4.7.4) und in der Zeit während des Zerfalls des elektronisch angeregten Zustands entsteht. Es ist schwierig zu begründen, dass diese Proteinschwingungen ebenso schnell aus dem  $BR_{570}$ -Zustand verschwinden wie die Chromophorbanden, denn bis die vom Chromophor absorbierte Energie vom  $S_1$ -Zustand durch Schwingungsrelaxation in die Proteinmoden dissipiert ist, vergehen mehrere Pikosekunden. Bei der Argumentation in Kapitel 4.6 wird für die Schwingungsrelaxation eine Zeit von 1 bis 2 ps bestimmt. In dieser Zeit sollte nur eine geringfügige Energierelaxation durch intermolekulare Wechselwirkung stattfinden.

Ein weiteres Indiz gegen eine verschwundene Grundzustandsabsorption des Chromophors ist, dass in den gemessenen Transienten bei negativen Verzögerungszeiten kein Mittenfrequenz typisches  $T_2$ -Verhalten zu erkennen ist.

Eine weitere mögliche Ursache für die "Verspätung" der Bleichbande liegt im Zerfall des elektrischen Feldes, das durch die elektronische Anregung des Chromophors erzeugt wurde, oder in der Isomerisierung. Durch die Isomerisierung könnten sich die Peptidbindungen, die nahe der kovalenten Bindungsstelle (Lysin216) liegen, bewegen, was sich dann sowohl in der Amid I- als auch in der Amid II-Schwingungsbande zeigen würde. Aufgrund der elektronischen Anregung des Chromophors geschieht eine Änderung der Ladungsverteilung in der Chromophorumgebung, diese wirkt sich dann sowohl auf die Schiffsche Base (Kapitel 4.4.) als auch auf eine Aminosäure oder auf Wassermoleküle aus.

In den Spektralbereichen um die Amid-Banden herum ist keine Differenzbande zu finden, deren negativer Anteil simultan zum positiven Anteil entsteht. Bei 1660  $\text{cm}^{-1}$  ist nur die negative Hälfte der Differenzbande zu sehen, die positive muss weit verschoben sein. Ein Wassermolekül könnte unbemerkt innerhalb der breiten Wasserbande verschieben oder die Schwingungsmode büßt ihre IR-Aktivität ein, womit sie im Spektrum nicht mehr sichtbar wäre. Hinweise auf eine Wassermolekülbewegung im K-Zustand gibt es unter anderem durch die atomar aufgelöste dreidimensionale  $BR_{570}$ - Struktur [Lue1999] und durch die K-Struktur [Edm1999]. Es sind deutliche Unterschiede bezüglich der Wasserposition in der unmittelbaren Umgebung der SB bestimmt worden. Auch durch eine molekulardynamische Kalkulation des K-Intermediats [Hay2002] wird eine Wasserbewegung simuliert, die auf die Ausrichtung der N-H-Bindung der SB reagiert.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist noch keine eindeutige Erklärung für das Absorptionsverhalten möglich, aber es kann festgestellt werden, dass die Ursache in der Chromophorumgebung zu suchen ist und nicht beim Chromophor selbst. Für eine Untersuchung dieses Problems bietet sich ein  $D_2O$ -Austausch an. Die Absorption der  $D_2O$ -Schwingungsbande verschiebt gegenüber der  $H_2O$ -Bande deutlich zu niedrigeren Wellenzahlen. Wenn beim  $D_2O$ - Experiment die Absorptionsdifferenz bei 1660  $\text{cm}^{-1}$  nicht zu

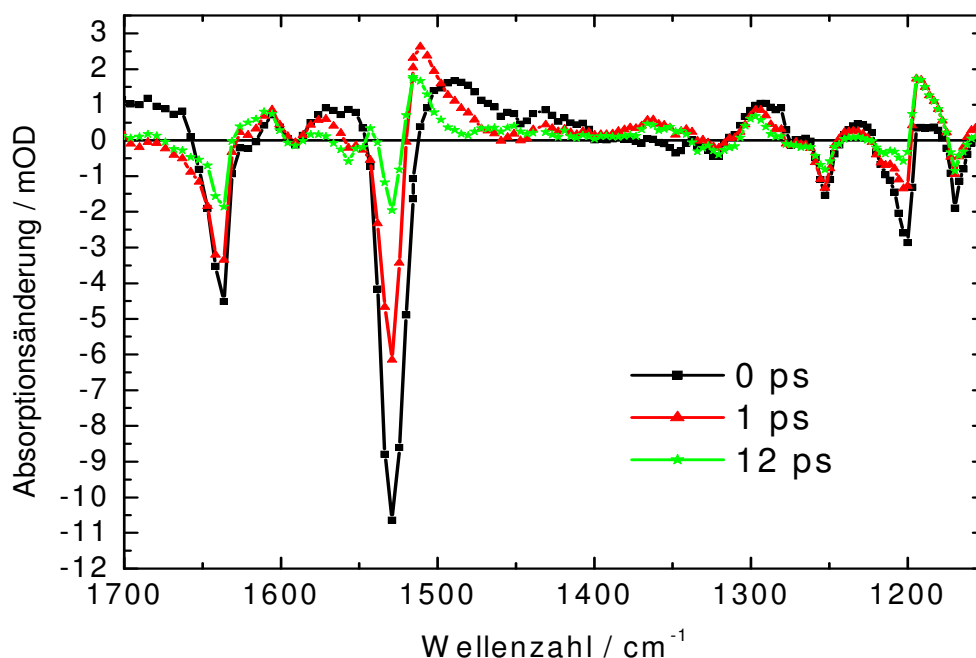
beobachten wäre, würde dies ein klares Indiz für eine Wasserbewegung sein.

Ob der Feldsprung die elektronische Anregung eine Proteinreaktion auslöst, sollte unabhängig von der Isomerisierung untersucht werden. Aus diesem Grund wird in Kapitel 4.8 das Protein bR5.12 gesondert untersucht, das einen artifiziellen Chromophor besitzt, der keine Isomerisierung zulässt.

## 4.7 Gesamtbetrachtung des Spektrums

Bisher sind nur einzelne spektrale Abschnitte vorgestellt und analysiert worden. Um eine übergeordnete Systematik in der Dynamik aller Absorptionsdifferenzbanden und im spektralen Muster festzustellen, wird nun das Spektrum von 1150 bis 1700  $\text{cm}^{-1}$  als Ganzes betrachtet. In diesem Kapitel werden die fs-Spektren mit einem zeitaufgelösten und einem statischen FTIR-Spektrum verglichen. Die Dynamik wird mit dem Global Fit und der SVD-Analyse zwischen 1460 und 1670  $\text{cm}^{-1}$  bestimmt. Für die Zuordnung der Schwingungsbanden im elektronisch angeregten Zustand werden die positiven Banden im 0 ps-Spektrum diskutiert.

Es ist nicht möglich, einen breiten Spektralbereich mit nur einem Probenfilm mit mehreren Transientenexperimenten (Kapitel 3.4.2) hintereinander zu messen, da ansonsten die Belastung der Probe zu groß wird. Für ein Spektrenexperiment wird an wenigen ausgewählten Zeitpunkten gemessen. Dadurch reduziert sich die Messzeit für ein Experiment und es kann mehrmals hintereinander der Spektralbereich gewechselt werden. Die Spektren in Abbildung 4.16 wurden nur an den Zeitpunkten 0, 1 und 12 ps in 20 Spektralbereichen (jeweils aus 10 Wellenzahlen bestehend) gemessen. So konnten drei breite Absorptionsdifferenzspektren zusammengesetzt werden, die innerhalb von 10 Stunden unter



**Abbildung 4.16:**

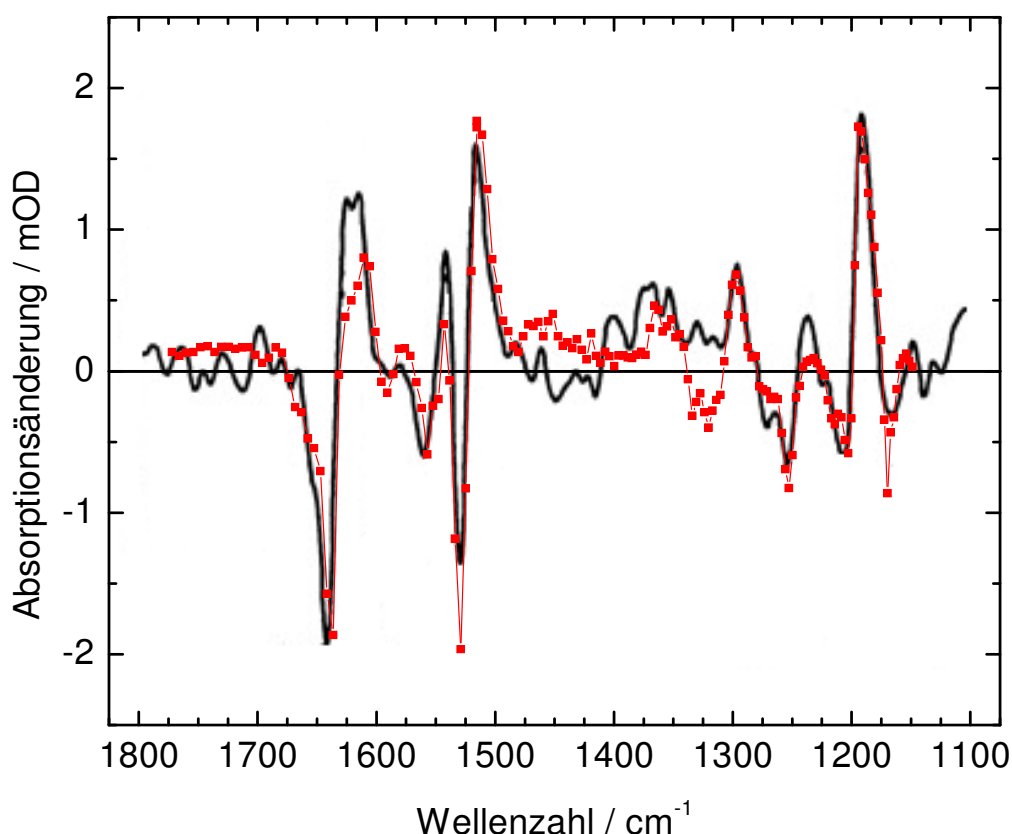
Gesamtspektrum zu den Zeiten 0 ps, 1 ps und 12 ps. Im 0 ps-Spektrum sind die Absorptionsbanden des elektronisch angeregten Zustands zu finden. Das 1 ps-Spektrum wird durch den J-Zustand geprägt, das 12 ps-Spektrum durch den K-Zustand. Im 1 ps-Spektrum ist das Muster des 13-cis-Isomers aus dem K-Spektrum (12 ps) vollständig entwickelt.

gleichen experimentellen Bedingungen mit einem Probenfilm aufgenommen wurden.

### 4.7.1 Das K-Differenzspektrum

Die hier vorgestellten Spektren decken einen wichtigen Spektralbereich ( $1150$  bis  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) ab, der für die Schwingungsbanden des bR-Moleküls charakteristisch ist. Mit der FTIR-Methode wird dieser Spektralbereich während des gesamten Photozyklus mit einer Zeitauflösung bis zu  $15\text{ ns}$  ausgemessen. An diesen FTIR-Spektren lassen sich die Strukturveränderungen von Proteingerüst, Chromophor, Aminosäuren und Wasser verfolgen. Da das K-Intermediat von  $3\text{ ps}$  bis zu  $2\text{ }\mu\text{s}$  (Abbildung 1.5) bestehen bleibt, werden bei einem Vergleich von einem ps-Spektrum mit einem ns-Spektrum zwar unterschiedliche Zeitpunkte aber der gleiche Zustand betrachtet. Ein bei Zimmertemperatur aufgenommenes  $15\text{ ns}$ -Spektrum [Röd1999a] soll hier als Referenz für das spektrale Muster des K-Zustands dienen und damit auch als Referenz für die 13-cis-Konfiguration.

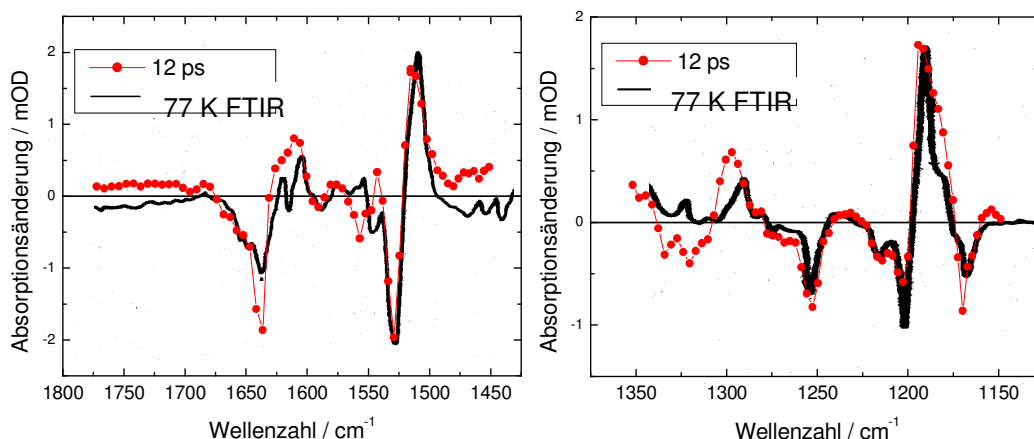
In der Abbildung 4.17 werden das  $12\text{ ps}$ -Spektrum und das  $15\text{ ns}$ -Spektrum übereinander gelegt. Es findet sich eine gute Übereinstimmung die zeigt, dass beide Messmethoden ein



**Abbildung 4.17:**

Übereinstimmung zwischen dem  $12\text{ ps}$ -Spektrum und dem  $15\text{ ns}$ -FTIR-Spektrum bei Zimmertemperatur [Röd1999a]. Das FTIR-Spektrum dient als Referenz für die 13-cis-Konfiguration des K-Zustands. Zwischen  $12\text{ ps}$  und  $15\text{ ns}$  findet nur eine minimale Strukturveränderung statt.

fast gleiches Spektrum mit definierter 13-cis-Konfiguration zu einem frühen und zu einem späteren Zeitpunkt in K erhalten. Es werden alle Bleichbanden und alle positiven Banden des 15 ns-FTIR-Spektrums vom 12 ps-Spektrum überdeckt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass im Fingerprint-Bereich, im C=C- und im C=NH-Streckschwingungsbereich die Bandenlagen gut übereinstimmen<sup>2</sup>. Die C=C-Streckschwingung des K-Zustands bei  $1515\text{ cm}^{-1}$  und die C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>-Streckschwingungsbande der 13-cis-Konfiguration bei  $1194\text{ cm}^{-1}$  zeigen das gleiche spektrale Muster. Die wenigen signifikanten Abweichungen entdeckt man bei  $1620\text{ cm}^{-1}$  (C=NH-Streckschwingung) und  $1320\text{ cm}^{-1}$  (N-H-Biegeschwingung). Diese spektralen Bereiche werden durch die Absorption der SB geprägt, deren Bandenposition empfindlich auf Ladungsverschiebungen in der Chromophorumgebung reagiert. Die Übereinstimmungen der Spektren sind so deutlich, dass eine grundlegende Veränderung der Chromophor-Konfiguration zwischen 12 ps und 15 ns ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 4.18 :**

Vergleich des 12 ps-Spektrums mit einem 77 K-FTIR-Spektrum [Sie1983]. Links: Ausschnitt vom Schiff Base- und Ethylenbereich zeigen bis auf  $1550\text{ cm}^{-1}$  gute Übereinstimmung. Rechts: Fingerprint-Bereich zeigt in beiden Spektren das gleiche Absorptionsdifferenzmuster.

Mit der FTIR-Methode konnte das Absorptionsspektrum des K-Intermediats mit statischen Tieftemperaturmessungen bestimmt werden, noch bevor es die technische Möglichkeit gab, die ns-Zeitauflösung zu erreichen. Bei diesen Messungen wird die Probe bei einer bestimmten Temperatur eingefroren und mit einem Lichtpuls angeregt. Der Photozyklus hält in dem Intermediat an, bei dem die thermische Energie nicht mehr ausreicht, um die Potentialschwelle zum nächsten Intermediat zu überwinden. So kann das entsprechende

<sup>2</sup> Beim Vergleich ist zu beachten, dass die Spektren mit unterschiedlicher spektraler Auflösung aufgenommen worden sind. Dadurch haben die Spektren spektral verschobene Stützstellen. Hierdurch kann der Eindruck entstehen, dass die Mittenwellenzahlen der Banden an unterschiedlichen Positionen lägen.

FTIR-Spektrum statisch aufgenommen werden. Für die Untersuchung des K-Intermediats wird die Probe bei 77 K eingefroren und der Photozyklus bleibt somit im K-Intermediat stehen.

Der Vergleich vom 12 ps-Spektrum mit dem 77 K-Spektrum [Sie1983] fällt ähnlich gut aus, wie der Vergleich mit dem 15 ns-Spektrum. Lediglich zwei kleine Unterschiede sind festzustellen. Bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  besitzt das 77 K-Spektrum ein verändertes Absorptionsdifferenzmuster gegenüber dem 12 ps-Spektrum und im Bereich C=NH-Streckschwingungsbande wird ein wesentlich kleinerer Unterschied zum 77 K-Spektrum gefunden. Diese Differenzen lassen sich so interpretieren, dass im eingefrorenen Zustand Veränderungen im Protein verhindert werden, die bei Raumtemperatur irgendwo zwischen 12 ps und 15 ns geschehen. Ein Absorptionsmuster wie in dem 77 K-Spektrum bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  wird in den zeitaufgelösten Spektren nur zu ganz frühen Zeiten ( $t_D < 1\text{ ps}$ ) festgestellt. Das besondere Absorptionsverhalten dieses Spektralbereichs wird im Kapitel 4.6 und 4.8 auf eine Proteinreaktion zurückgeführt, deren Ursache bei 77 K eingefroren wird. Hierfür kommt unter anderem die Immobilität von proteingebundenem Wasser in Frage.

## 4.7.2 Das J-Differenzspektrum

Mit den Ergebnissen aus der sichtbaren fs-Spektroskopie ist der J-Zustand nicht eindeutig charakterisiert, da die Banden von BR<sub>570</sub> mit den rotverschobenen Produktbanden zwischen 590 und 640 nm sehr stark überlappen<sup>3</sup>. Mit den Produktbanden im sichtbaren Spektralbereich korrespondieren die Ethylenstreckschwingungen im IR-Bereich (Kapitel 4.2.1). Es wird, wie im sichtbaren Spektralbereich zu frühen Zeiten ( $t_D < 1\text{ ps}$ ), ein zur K-Bande (C=C-Streckschwingung bei  $1515\text{ cm}^{-1}$ ) rotverschobenes Absorptionsmaximum beobachtet. Diese Bande bei  $1511\text{ cm}^{-1}$  wird der C=C-Streckschwingung des J-Zustands zugeordnet. Damit wird für das erste und zweite Photozyklusprodukt die von Rimai et al. [Rim1973] aufgestellte Korrelation (Kapitel 1.1.1.2) bestätigt, was als Argument dient, dass das Spektrum nach 1 ps charakteristisch für den J-Zustand ist.

Beim Vergleich des 12 ps-Spektrums mit dem 1 ps-Spektrum ist zu erkennen, dass die 13-cis-Bande im Fingerprint-Bereich nach 1 ps voll entwickelt ist (Abbildung 4.16). Aber nicht nur die positiven Fingerprint-Banden, sondern das komplette Spektrum zeigt für die positiven Banden die große Übereinstimmung zum 12 ps-Spektrum. Auch dieser indirekte Vergleich mit dem 15 ns-FTIR-Spektrum unterstützt die Aussage von Kapitel 4.3.1, dass die Isomerisierung nicht zwischen dem J- und dem K-Zustand abläuft.

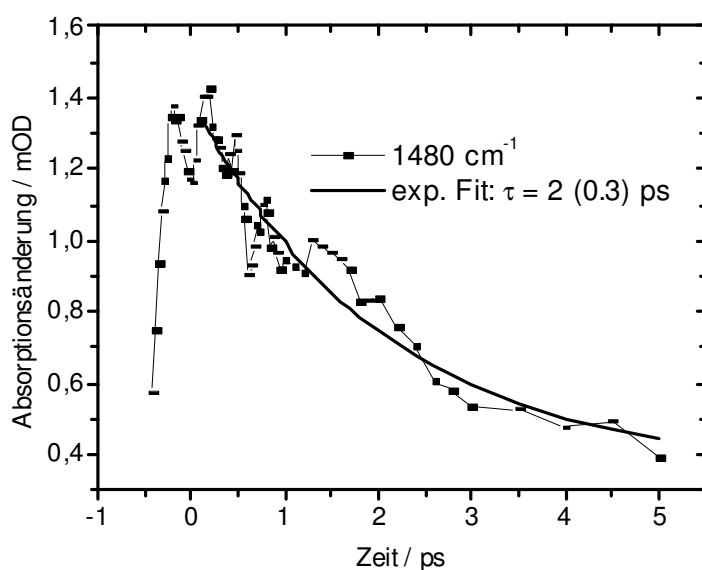
Ein großer Unterschied in der Amplitude der Bleichsignale liegt zwischen 1 und 12 ps. Der Rückgang des Bleichsignals ist bei 1 ps noch nicht abgeschlossen. Im Bereich von 1500 und

---

<sup>3</sup> Die Banden der elektronischen Übergänge haben in bR eine Breite von ungefähr 100 nm.

$1570\text{ cm}^{-1}$  gibt es keine Übereinstimmung der positiven Amplituden. Die Differenz bei  $1500\text{ cm}^{-1}$  wird in diesem Kapitel diskutiert, die bei  $1570\text{ cm}^{-1}$  im Kapitel 4.7.4.

Im  $1\text{ ps}$ -Spektrum wird eine deutliche asymmetrische Verbreiterung der C=C-Streckschwingungsbande beobachtet. Die Bande besitzt einen flachen Abfall zu niedrigeren Wellenzahlen hin. Die SVD- und die Amplitudenspektren der langsamen Zeitkonstante (1 bis  $2\text{ ps}$ ) aus Kapitel 4.2.1.1 haben in diesem Spektralbereich bei  $1500\text{ cm}^{-1}$  deutlich positive Amplituden. Dies bedeutet für die Dynamik, dass der Zerfall dieser Verbreiterung durch die langsame Zeitkonstante (1 bis  $2\text{ ps}$ ) beschrieben wird. Das  $0,5\text{ ps}$ -Amplitudenspektrum deckt diesen Bereich nicht vollständig ab. Aus dem verbreiterten Bereich wird eine Transiente mit einem exponentiellen Fit in Abbildung 4.19 dargestellt. Die Entstehung der Absorptionsdifferenz kann nicht vollständig aufgelöst werden. Der Zerfall wird mit einer  $2\text{ ps}$ -Zeitkonstante angepasst. In diesem Spektralbereich machen sich die  $T_2$ -Effekte der Bleichbande bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  als eine schmale positive Oszillation nahe dem Zeitnullpunkt bemerkbar. Da das Signal auch positiv ist, wird der Signalanstieg von der  $T_2$ -Zeit und der Systemantwort verbreitert, so dass kein Anstieg aufzulösen ist. Würde es sich um eine Produktbande handeln, sollte diese mit  $0,5\text{ ps}$  erscheinen, wie es bei  $1511\text{ cm}^{-1}$  der Fall ist. Die Zerfallszeit von  $2\text{ ps}$  in der Transiente bei  $1480\text{ cm}^{-1}$  weicht nur um  $1\text{ ps}$  von der zu erwarteten J-Zerfallszeit von  $\sim 3\text{ ps}$ , die mit der sichtbaren Spektroskopie bestimmt wurde (Abbildung 4.8), ab. Da die C=C-Streckschwingungsbande von K bei  $12\text{ ps}$  (Abbildung 4.17) eine typische Lorentz-Bande mit der Breite von  $16\text{ bis }20\text{ cm}^{-1}$  besitzt, ist die asymmetrisch verbreiterte  $1511\text{ cm}^{-1}$ -Bande bei  $1\text{ ps}$  besonders auffällig. Eine Erklärung hierfür ist, dass das Bandenmuster bei  $1\text{ ps}$  durch heiße Schwingungsübergänge geprägt wird.



**Abbildung 4.19:**

Transiente bei  $1480\text{ cm}^{-1}$ : Der Zerfall von heißen Schwingungsbanden kann für die Dynamik der Absorptionsbande bei  $1500\text{ cm}^{-1}$  verantwortlich sein.

### 4.7.2.1 Heiße Schwingungsbanden

Das bR-Molekül wird durch ein Photon mit 2 eV (570 nm) angeregt, davon werden für den Photozyklus nur 0,5 eV im Photoproduktzustand gespeichert [Bir1990]. Der Rest der Energie wird an die Umgebung abgegeben und macht sich in Form von heißen Schwingungsbanden bemerkbar.

Heiße Schwingungsbanden entstehen dann, wenn Überschussenergie intramolekular auf angeregte Schwingungsniveaus umverteilt wird (Kapitel 2.1.2.1). Sie besitzen nur eine kurze Lebensdauer, da durch die intermolekulare Energieumverteilung die heiße thermische Besetzung wieder abgebaut wird<sup>4</sup>. Durch intramolekulare Energieumverteilung auf thermalisierte Zustände gemäß der *Boltzmann-Verteilung*

$$E_{\text{ph}} = \sum_i \frac{\hbar\omega_i}{1 - \exp(-\hbar\omega_i / kT)} - E(T_0) \quad (4.12)$$

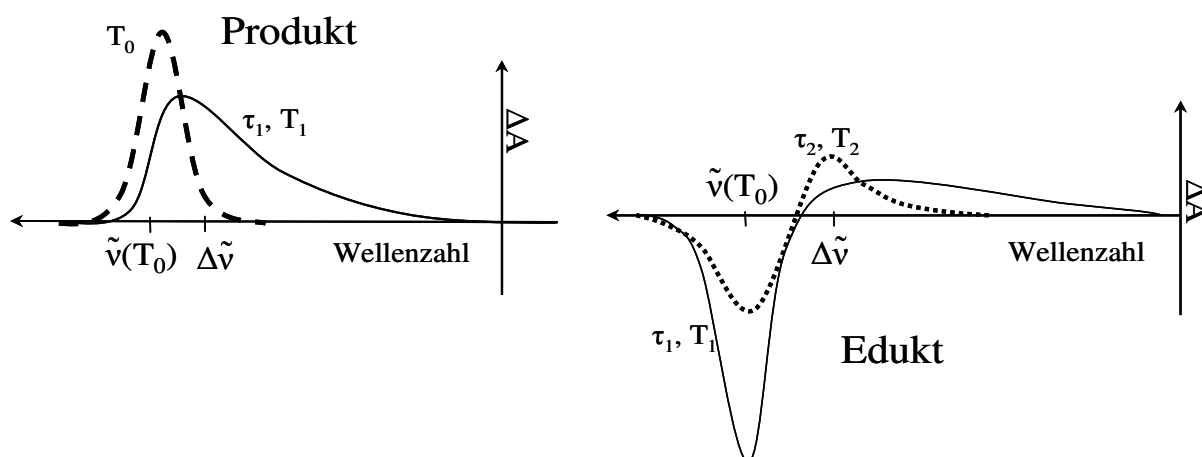
$E_{\text{ph}}$ : Anregungsenergie des Photons,  $E(T)$ : Energie des Moleküls bei Raumtemperatur (300 K) vor der Anregung,  $i$ : Anzahl aller angeregten Schwingungsmoden mit den Frequenzen  $\omega_i$ .

kann eine anfängliche interne Temperatur definiert werden. Die in dem Molekül steckende Energie wirkt sich wie eine Temperaturerhöhung aus. Im kalten Zustand dominieren die Schwingungsübergänge  $v_0 \rightarrow v_1$ . Im Spektrum wird dann eine Absorptionsbande in Form einer symmetrischen Lorentzbande beobachtet (Abbildung 4.20). Im heißen Zustand werden weitere Schwingungsübergänge möglich. Ihre Absorptionsbande hängt entscheidend von der anharmonischen Kopplung der ausgewählten Schwingungsmoden mit den restlichen Schwingungsmoden des Moleküls ab. In einer Modellkalkulation wurde gezeigt, dass die negativen nichtdiagonalen anharmonischen Kopplungskonstanten zu einer Rotverschiebung der Schwingungsmoden führen [Ham1997a]. In dieser Kalkulation wird die zeitabhängige Bandenverschiebung für Produkt- und Eduktbanden mit der internen Temperatur beschrieben. Man erhält spektrale Muster für die heißen Banden, wie sie in der Abbildung 4.20 dargestellt sind.

---

<sup>4</sup> Die intramolekulare Schwingungsumverteilung und der intermolekulare Energietransfer vom Molekül auf die Umgebung sind eng miteinander verbunden. Die Kinetik von beiden Prozessen hängt stark von der Umgebung des Moleküls und von seiner Größe ab.



**Abbildung 4.20:**

Bandenmuster der heißen Schwingungsbanden nach Hamm et al. [Ham1997a]. Links: Kalte Bande mit der Temperatur  $T_0$  entspricht dem  $\nu_0 \rightarrow \nu_1$ -Schwingungsübergang. Die heiße Schwingungsbande zur Verzögerungszeit  $\tau_1$  ist um  $\Delta\tilde{\nu}$  rotverschoben. Die Temperatur  $T_1$  entspricht dieser Verschiebung. Rechts: Heiße Eduktbande zur Verzögerungszeit  $\tau_1$ . Je weiter die Abkühlung fortschreitet, geht die negative Bande zurück und die Verschiebung verringert sich (Zeitpunkt  $\tau_2$ ). Ist das Molekül abgekühlt, verschwindet die Bande.

Beim Vergleich der Bandenmuster aus Abbildung 4.20 mit den Spektren im Ethylenstretschwingungsbereich zu frühen Zeiten ( $< 1,5$  ps) (Abbildung 4.5) sind Ähnlichkeiten erkennbar. Die Verbreiterung der  $1511\text{ cm}^{-1}$ -Bande hat die Form einer heißen Produktbande (Abbildung 4.20, links). Bei  $1529\text{ cm}^{-1}$  sind die große negative Amplitude bei der Mittenwellenzahl und die rotverschobene positive Bande bei  $1500\text{ cm}^{-1}$  Indizien für eine heiße Eduktbeiträge zum Bleichbandenspektrum. Da um  $1500\text{ cm}^{-1}$  sowohl kalte als auch heiße Produkt- und Eduktbanden überlappen können, ist nicht zu unterscheiden, wie die Beiträge der heißen Produktbanden und Eduktbanden anteilig eingehen. Aber es ist anzunehmen, dass die Bleichbande einen dominierenden Anteil hat, da bei dem strahlungslosen Übergang von  $S_1$  nach  $BR_{570}$  die gesamte Anregungsenergie dissipieren muss. Dies korrespondiert mit einer hohen internen Temperatur. Aus dem Spektrum kann bei  $0,2$  ps eine Wellenzahlverschiebung von  $30\text{ cm}^{-1}$  abgeschätzt werden. Dies entspricht einer Temperatur von  $660\text{ K}$ .

Geht man davon aus, dass die positive  $1519\text{ cm}^{-1}$ -Produktbande bei  $12$  ps kalt ist, kann angenommen werden, dass die  $1511\text{ cm}^{-1}$ -Bande bei  $1$  ps eine heiße Produktbande darstellt. Die spektrale Verschiebung von  $8\text{ cm}^{-1}$  ergibt eine interne Temperatur von  $480\text{ K}$ . Überträgt man die Bandendiskussion auf die Produktzustände, liegt zu  $1$  ps bei  $1511\text{ cm}^{-1}$  eine heiße K-Bande vor, die auch als J-Bande, welche durch heiße Produktschwingungsübergänge geprägt wird, bezeichnet wird. Aus diesen Abschätzungen ergibt sich, dass die Beiträge der heißen Eduktschwingungsbanden (all-trans) höher sind als die der heißen Produktbanden (13-cis).

Für die abgetasteten Schwingungsübergänge kommen ausschließlich heiße C=C-

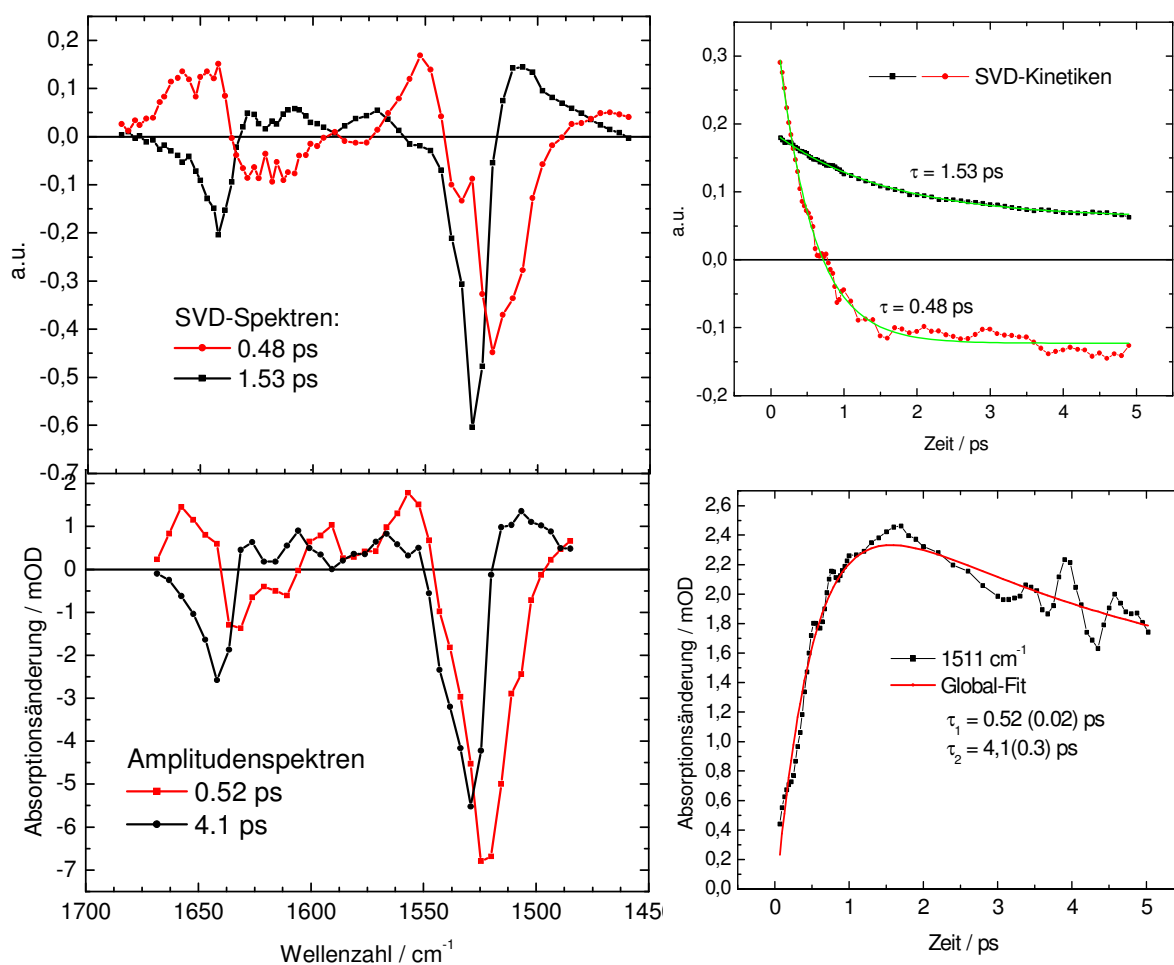
Streckschwingungen des elektronischen Grundzustands in Frage; denn wenn der Zerfall des angeregten elektronischen Zustands mit 0,5 ps abläuft, kann kein Abkühlungsprozess im elektronisch angeregten Zustand mit einer 2 ps-Zeitkonstante verantwortlich sein.

Für das bR-Molekül sind bei Doig et al. [Doig1991] heiße Schwingungsbanden in Betracht gezogen worden. Bei Doig et al. [Doi1991] wird mit anti-stokes-Raman-Spektroskopie ein spektral breitbandiger Zerfall im Bereich der K-Bande mit 2,5 ps bestimmt. Dieser Zerfall wird einem Abkühlungsprozess von heißen Schwingungsbanden zugeordnet. Allerdings konnte keine entsprechende Bandenverschiebung aufgelöst werden.

Das Ergebnis aus dem 1 ps-Spektrum ist, dass sich dieses Spektrum aus zwei heißen Zustände mit unterschiedlicher Isomerisierung zusammensetzt. Der J-Zustand ist heiß und hat die 13 cis-Konfiguration. Die anderen heißen Banden werden dem neu eingeführten all-trans-Zustand BR\* zugeordnet (Kapitel 5).

### 4.7.3 Kinetische Analyse von 1470 bis 1670 $\text{cm}^{-1}$

Bisher sind die Spektralbereiche der C=C- und C=NH-Streckschwingung einzeln vorgestellt und analysiert worden. Dadurch, dass diese Auswahl spektral beschränkt wird, werden Banden nicht berücksichtigt, die in diesen Bereichen nicht auftauchen oder nur teilweise überlappen. Nun gilt es, den Spektralbereich zwischen 1460 und 1670  $\text{cm}^{-1}$  zusammenhängend zu analysieren, damit klar wird, dass das Verhalten aller Schwingungsbanden mit einem kleinen Parametersatz beschrieben werden kann.



**Abbildung 4.21:**

SVD-Analyse und Global Fit des gesamten Datensatzes (1470 bis 1670  $\text{cm}^{-1}$  von 0,15 bis 5 ps): Aus der SVD-Analyse werden zwei signifikante Spektren mit jeweils einer monoexponentiellen Kinetik gewonnen mit den singulären Werten  $s_1(1,53 \text{ ps}) = 10 \%$  und  $s_2(0,48 \text{ ps}) = 2 \%$ . Die Amplitudenspektren aus dem globalen biexponentiellen Fit (unten links) und die SVD-Spektren (oben links) haben über den ganzen Spektralbereich ein ähnliches Muster. Unten rechts ist beispielhaft der globale Fit durch die Transiente bei 1511  $\text{cm}^{-1}$  gelegt.

Hierfür sind in dem Spektralbereich zwischen 1470 und 1670  $\text{cm}^{-1}$  die Transienten von 0,15 bis 5 ps zu einem homogenen Datensatz (50 Wellenzahlen  $\times$  70 Zeitpunkte) zusammengesetzt worden, der sowohl mit dem Global Fit als auch mit der SVD analysiert

worden ist (Abbildung 4.21). Mit der SVD-Analyse stellt man fest, dass ein biexponentieller Fit für die Beschreibung des Absorptionsverhaltens notwendig ist. Es ergeben sich nur zwei signifikante singuläre Werte mit 10 % und 2 %, die weiteren Werte sind kleiner als 0,4 %. Da die beiden entsprechenden SVD-Kinetiken jeweils ein monoexponentielles Zeitverhalten zeigen, bedeutet dies für das Global Fit-Modell, dass es zwei Spezies gibt, deren Zeitverhalten mit einer Summe von zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden kann. Deshalb sind zwei Reaktionsschemata möglich:  $A \rightarrow B \text{ \& } C \rightarrow D$  oder  $A \rightarrow B \rightarrow C$ .

Die SVD-Analyse und der Global Fit kommen jeweils zu dem Ergebnis, dass für eine Fitanpassung zwei Zeitkonstanten ausreichen. Mit einer zusätzlichen dritten Exponentialfunktion werden die Daten genauso gut beschrieben, wie mit zwei Exponentialfunktionen. Das dritte Amplitudenspektrum hat keine mit den anderen beiden vergleichbare signifikante Struktur.

Die Amplitudenspektren und die SVD-Spektren von den jeweils korrelierten Zeitkonstanten haben ein ähnliches Muster. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die kürzere Zeitkonstante (0,48 und 0,52 ps) und die längere Zeitkonstante (4,1 und 1,5 ps) jeweils die gleiche Dynamik der gleichen Spezies beschreiben. An dem Fit durch die Transiente von  $1511 \text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 4.21, unten rechts) ist gut zu erkennen, dass die Variationsbreite für die 4 ps-Zeitkonstante zwischen 2 und 4 ps liegen kann. Der ausgewählte Zeitbereich für den Fit ist zu kurz, um eine Zeitkonstante von 3 ps mit einem kleinen Fehler zu fitten.

An dem zusammenhängenden Datensatz ist gut zu erkennen, dass in den charakteristischen Spektralbereichen gleiches Zeitverhalten auftritt; denn die Zeitkonstanten im Fingerprint-, im Ethylen- und im SB-Bereich sind qualitativ sehr ähnlich. Es gibt eine kurze Zeitkonstante mit  $\sim 0,5$  ps und eine lange mit 1,5 bis 4 ps. Die kurze Zeitkonstante ist sehr stabil gegenüber veränderten Fitbedingungen. Auch im Fingerprintbereich (Kapitel 4.3.1) wird eine 0,55 ps-Zeitkonstante für die 13-cis-Bandenentstehung gefunden.

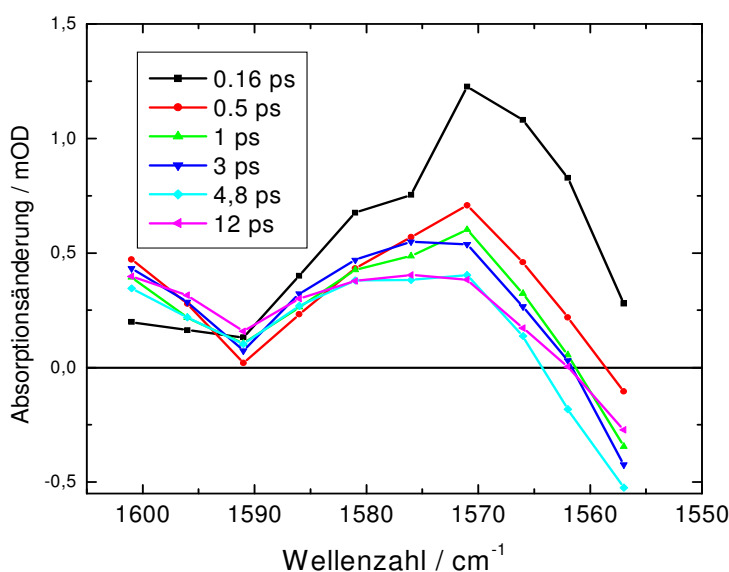
Für die Fitanpassung der langen Zeitkonstante sind die Datensatzlänge, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und der Spektralbereich kritische Parameter. Zwei unterschiedliche Prozesse, die ungefähr gleich schnell ablaufen, können nicht spektral getrennt werden, da sie ein gemeinsames Amplitudenspektrum haben. Der Rückgang der Bleichsignale und der Zerfall des J-Zustands werden beide mit der längeren Zeitkonstante beschrieben. Diese beiden Prozesse laufen nicht hintereinander ab, sondern parallel in unterschiedlichen Reaktionszweigen. In Kapitel 5.1 werden die gewonnen Erkenntnisse in ein erweitertes Reaktionsschema übertragen.

#### **4.7.4 Schwingungsbande des $S_1$ -Zustands**

Der Zerfall des elektronisch angeregten Zustands wird im sichtbaren Spektralbereich mit 0,5 ps bestimmt. Im Infraroten stellt sich die Frage, wo und wie die Schwingungsbanden des

elektronisch angeregten Zustands absorbieren. Darüber gibt das 0 ps-Spektrum Aufschluss, da dort die positiven Absorptionsbanden dem angeregten Zustand zugeordnet werden können. Das 0-ps-Spektrum bedeutet, dass dort der Anregungs- und der Abtastpuls gleichzeitig auf die Probe treffen. Deshalb sind in diesem Spektrum Beiträge von kohärenten Effekten, die die photoinduzierten Absorptionsdifferenzen überlagern möglich. Die Messungen von Leerproben haben bei der Anregungsenergie von  $< 0,6 \mu\text{J}$  kaum auflösbare Fenstereffekte gezeigt. Die  $T_2$ -Effekte haben zum Zeitnullpunkt die Auswirkung des verlängerten Signalanstiegs, so dass schnelle Anstiege ( $\tau < 150 \text{ fs}$ ) als instantan erscheinen. Die Banden des elektronisch angeregten Zustands werden instantan erwartet.

Im 0 ps-Spektrum von Abbildung 4.16 sind positive Banden bei  $1300$ ,  $1470$ ,  $1570$  und  $1660 \text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Die Dynamik des elektronisch angeregten Zustands sollte vor allen Dingen in den Banden ausgeprägt sein, in denen die Kopplung an das  $\pi$ -Elektronensystem groß ist. Dafür kommen die C=C-Streckschwingungen in Frage. Bei Song et al. [Son1998] werden durch RR-Spektroskopie an zwei Positionen ( $1450$  und  $1570 \text{ cm}^{-1}$ ) deutliche  $S_1$ -Schwingungsbanden gefunden. Bei  $1570 \text{ cm}^{-1}$  findet sich eine Übereinstimmung in der spektralen Position zwischen den RR-Spektren und dem hier vorgestellten 0 ps-Spektrum.



**Abbildung 4.22:**

Transiente Spektren im Bereich der C=C-Streckschwingung des elektronisch angeregten Zustands. Bei 0,16 ps ist die Bande instantan vorhanden und zeigt eine 0,5 ps-Zerfallszeit (Abbildung 4.23). Dies macht die Zuordnung zum  $S_1$ -Zustand deutlich.

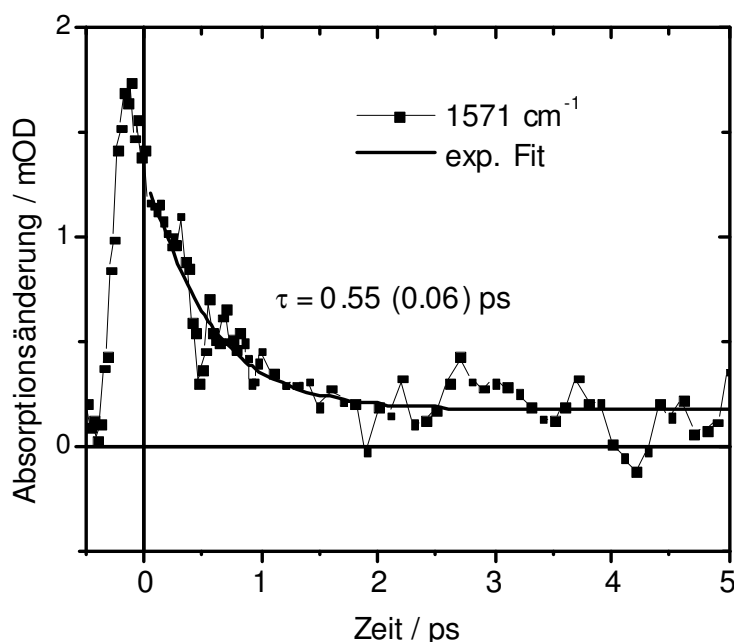
Dieser spektrale Bereich wurde gesondert für die Untersuchung dieser Bande vermessen und analysiert. Der Datensatz dazu ist in Abbildung 4.22 dargestellt.

Die Absorption im Maximum der Bande zerfällt mit einer Zeitkonstante von 0,55 ps und zeigt damit die typische Zeit für den  $S_1$ -Zerfall. Die  $1450 \text{ cm}^{-1}$ -Bande von Song et al. [Son1998] kann nicht in dem 0 ps-Spektrum gefunden werden. Wenn nur die spektrale Position ausschlaggebend ist, kann diese RR-Bande mit der  $1470 \text{ cm}^{-1}$ -IR-Bande verglichen werden. Dagegen spricht, dass die  $1470 \text{ cm}^{-1}$ -Bande mit 2 ps zerfällt, wie der Fit in der

Abbildung 4.19 zeigt (stellvertretend bei  $1480\text{ cm}^{-1}$ ). Um herauszufinden, welche Banden ebenfalls eine  $S_1$ -Zerfallsdynamik aufweisen, kann das  $0,48\text{ ps}$ -Amplitudenspektrum von Abbildung 4.21 nach positiven Banden überprüft werden. Es gibt bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  eine solche Bande; deren Dynamik wird aber einer Proteinreaktionen zugeordnet.

Die Dynamik der positiven Absorptionsdifferenzbande zeigt einen Zerfall von  $0,55\text{ ps}$  (Abbildung 4.23), was der Zerfallszeit des elektronisch angeregten Zustands entspricht. Somit kann die Absorptionsdifferenzbande bei  $1570\text{ cm}^{-1}$  der C=C-Streckschwingung im elektronisch angeregten Zustand zugeordnet werden.

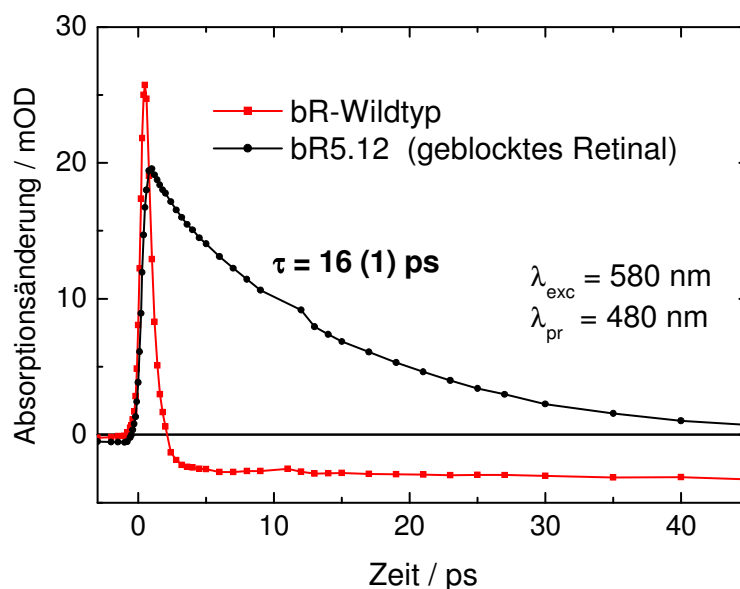
Aber die Auflösung einer Dynamik und eine Zuordnung der Schwingungsbanden im elektronisch angeregten Zustand ohne kohärente Überlagerungen ist an bR-Wildtyp mit der vorliegenden Zeitauflösung und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht möglich.



**Abbildung 4.23:**

Dynamik der C=C-Streckschwingung im elektronisch angeregten Zustand. Die  $0,55\text{ ps}$ -Zerfallszeit ist ein deutliches Kriterium für die Zuordnung zum  $S_1$ -Zustand.

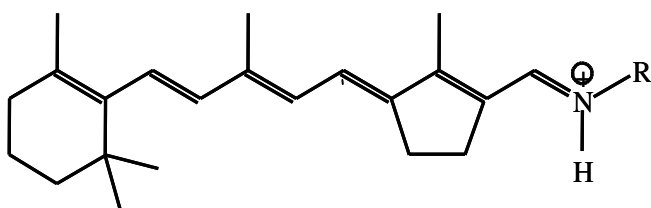
## 4.8 Das Protein mit “geblocktem Retinal“ (bR5.12)



**Abbildung 4.24:**

Dynamik des bR5.12 im Vergleich zum bR-Wildtyp in Suspension. Die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands von bR5.12 beträgt im sichtbaren Spektralbereich 16 ps gegenüber 0,5 ps des bR-Wildtyps bei der Probewellenlänge  $\lambda_{pr}=480$  nm (Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}=580$  nm)

Die Primärreaktion in Bakteriorhodopsin besteht aus mehreren Prozessen, die sequentiell und parallel ablaufen. Deshalb ist es schwierig die einzelnen Prozesse, wie sie in den Kapiteln über die C=C- und die C-C-Streckschwingung schon beschrieben wurde, zu trennen. In der Diskussion dieser Spektralbereiche wurden die Dynamik und das Spektrum des elektronisch angeregten Zustands kaum berücksichtigt. In Kapitel 4.7.4 wurde eine spektrale Zuordnung der C=C-Streckschwingung im elektronisch angeregten Zustand getroffen, allerdings in einem Zeitbereich mit kohärenten Überlagerungen. Zudem kann die Dynamik auf der  $S_1$ -Oberfläche nicht verfolgt werden, da die Zeitauflösung nicht ausreicht.

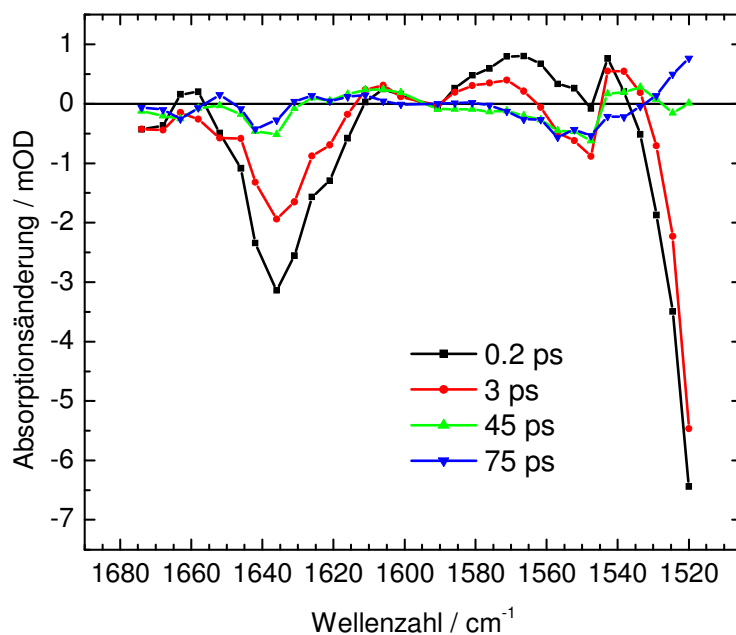


**Abbildung 4.25:**

Struktur des Chromophors in bR5.12: Der  $C_{12}-C_{13}=C_{14}$ -Teil der Polyenkette wird durch einen fünf-Ring versteift und so die alltrans-Konfiguration fixiert. (N-H: Schiff'sche Base, R: Lysin 216)

In diesem Kapitel wird der elektronisch angeregte Zustand ohne überlagernde Photozyklusreaktionen an einem Protein untersucht, das sich vom bR-Wildtyp durch seinen sterisch veränderten Chromophor unterscheidet. Der all-trans-Retinalchromophor ist an der C<sub>13</sub>=C<sub>14</sub>-Bindung durch einen fünf-Ring in der Polyenkette fixiert, wodurch eine Verdrehung um diese Bindung verhindert wird (Abbildung 4.25). Die typische all-trans-13-cis-Isomerisierung wird geblockt, deshalb wird bei diesem Protein bR5.12 auch vom "geblockten Retinal" gesprochen. Die Proteinumgebung des Retinalchromophors bleibt die gleiche wie in der nativen Struktur von bR-Wildtyp.

Im sichtbaren Spektralbereich bestätigen eigene fs-Messungen am Protein bR5.12, dass der elektronisch angeregte Zustand bei 480 nm mit 16 ps zerfällt (Abbildung 4.24) und ohne Isomerisierung und Photozyklus direkt in den Ausgangszustand zurückkehrt [Rou1998; Aha2001]. Bei Ujj et al. [Ujj2000] wird mit der CARS-Spektroskopie an bR5.12 gezeigt, dass von der Anregung bis zur Rückkehr in den Ausgangszustand die all-trans-Konfiguration erhalten bleibt.



**Abbildung 4.26:**

Transiente bR5.12-Spektren: Bei 150 fs sind die Banden bei 1520 cm<sup>-1</sup> (C=C) und bei 1635 cm<sup>-1</sup> (C=NH) negativ; die Bande bei 1570 cm<sup>-1</sup> ist positiv. Zum Zeitpunkt des 45 ps-Spektrums ist der elektronisch angeregte Zustand zerfallen; bei 1550 cm<sup>-1</sup> bleibt eine Restabsorption sichtbar.

Aus einer bR5.12-Suspension von M. Sheves (Weizmann-Institut, Israel) wurde bei pH 7 und 15 mM KCL ein Probenfilm, wie er in Kapitel 3.4.1 beschrieben wird, präpariert. Das Absorptionsmaximum vom purpurnen bR5.12 liegt im sichtbaren Spektralbereich, ebenso wie beim bR-Wildtyp bei 570 nm. Die IR-Messungen laufen nach dem gleichen Versuchsprotokoll wie für den bR-Wildtyp ab. Es gibt eine kleine Abweichung; die Rotations- und Hubgeschwindigkeit der Probe kann wegen der verkürzten



Reaktionszykluszeit herabgesetzt werden. Dies wirkt sich positiv auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus.

Es werden in dem Spektralbereich zwischen 1500 und 1670  $\text{cm}^{-1}$  transiente IR-Absorptionsdifferenzen gemessen. Die Spektren in Abbildung 4.26 zeigen die Bleichbande der in-Phase C=C-Streckschwingung bei 1520  $\text{cm}^{-1}$  und die C=NH-Streckschwingung bei 1630  $\text{cm}^{-1}$ . Die gegenüber dem bR-Wildtyp leichte Verschiebung der Absorptionsbanden reflektiert die Auswirkung des fünf-Rings auf die Schwingungsmoden.

### 4.8.1 Die Dynamik im $S_1$ -Zustand von bR5.12

Der Datensatz aus dem die transienten Spektren von Abbildung 4.26 zusammengesetzt ist, wird mit Global Fit und SVD analysiert (Abbildung 4.27). Mit beiden Methoden kommt man zu dem Ergebnis, dass der Zerfall der positiven und der negativen Absorptionsbanden im Spektralbereich zwischen 1500 und 1670  $\text{cm}^{-1}$  mit zwei Zeitkonstanten beschrieben werden muss. Hierbei handelt es sich um eine lange Zeitkonstante mit 17 bzw. 14,5 ps und um eine kurze mit 2,1 bzw. 2,7 ps.

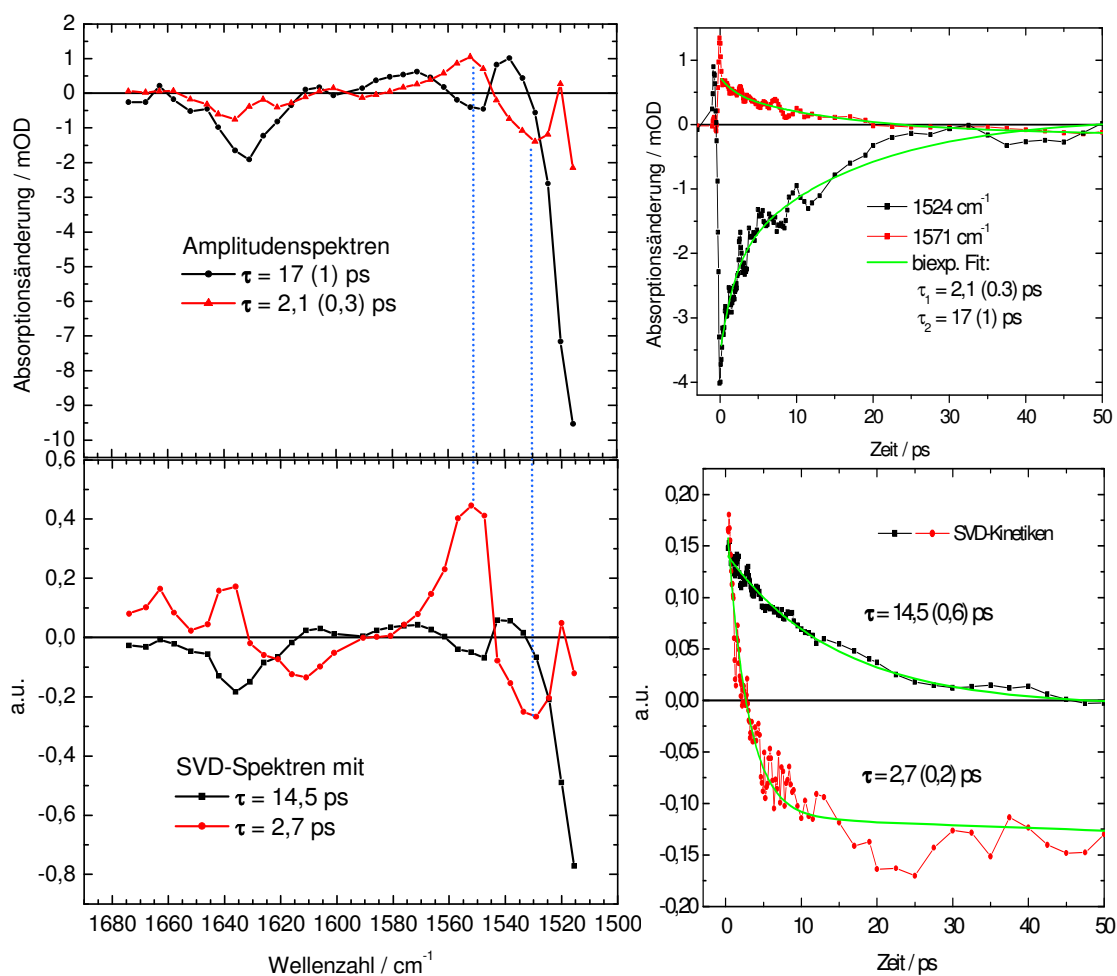
Die 17 ps-Zeitkonstante kann für die Rückkehr des Systems in den elektronischen Grundzustand bestätigt werden [Ujj2000], wie es die Bleichbanden bei 1520 und 1630  $\text{cm}^{-1}$  zeigen. Neu ist die zweite Zeitkonstante mit 2,1 ps. Sie wurde im sichtbaren Spektralbereich bisher nicht bestimmt. Bei Ujj et al. [Ujj2000] wurde nur die 17 ps-Zerfallszeit veröffentlicht.

Der elektronisch angeregte Zustand zeigt sich im 0,2 ps-Spektrum an den positiven und instantanen Absorptionsdifferenzen. Eine signifikante positive Bande wird bei 1570  $\text{cm}^{-1}$  gefunden. Sie zeigt die erwartete 17 ps- $S_1$ -Zerfallsdynamik (Abbildung 4.26), womit die C=C-Streckschwingung im elektronisch angeregten Zustand zweifelsfrei identifiziert werden kann.

Die zusätzliche 2,1 ps-Zeitkonstante hat in den Spektralbereichen um 1550 und 1660  $\text{cm}^{-1}$  ihre größte Signifikanz, wie man an den SVD- und den Amplitudenspektren erkennt. Dadurch, dass die Amid I- und Amid II-Schwingung (Kapitel 4.6) in diesem Spektralbereichen absorbieren, kann diese Absorption mit einer Proteinreaktion verknüpft werden. Im Amplitudenspektrum scheint die 2,1 ps-Zeitkonstante die Dynamik einer Differenzbande widerzuspiegeln.

Die Transiente bei 1552  $\text{cm}^{-1}$  (Abbildung 4.28) zeigt wie beim Wildtyp ein schnelles Absinken der Absorption und einen Rückgang des negativen Signals auf einen konstanten Wert. Aufgrund des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses hat die Transiente bei 1663  $\text{cm}^{-1}$  keinen klaren systematischen Verlauf wie bei 1552  $\text{cm}^{-1}$ . Es entsteht verzögert mit der 2,1 ps-Zeitkonstante eine negative Absorptionsdifferenz, die als Restabsorption bestehen bleibt.

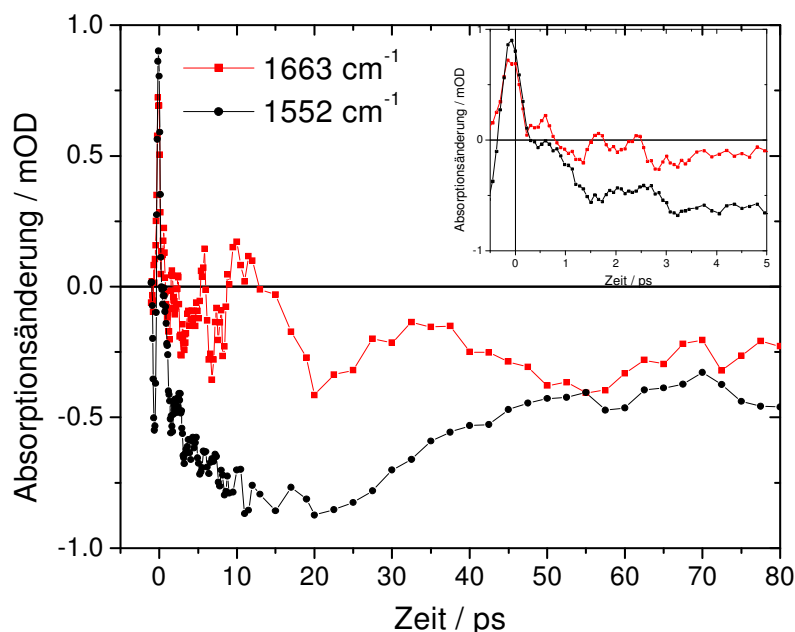
Dieses Verhalten ist bemerkenswert; denn der  $S_1$ -Zustand läuft direkt ohne Photozyklus in



**Abbildung 4.27:**

Global Fit und SVD-Analyse im Spektralbereich zwischen 1500 und 1670  $\text{cm}^{-1}$  vom bR5.12: Die SVD-Analyse ( $s_1(14,5 \text{ ps}) = 9 \%$  und  $s_2(2,7 \text{ ps}) = 1 \%$ ) und der Global Fit zeigen vergleichbare Resultate. Der biexponentielle globale Fit ergibt ein 17 ps-Amplitudenspektrum für die Zerfallsdynamik des elektronisch angeregten Zustands und eine 2 ps-Zeitkonstante für den Amid I- und Amid II-Bereich.

den  $S_0$ -Zustand zurück. Daher sollten alle Proteinmoleküle nach 80 ps vollständig in den Ausgangszustand zurückgekehrt sein. Es wird aber festgestellt, dass es langlebigere Absorptionsdifferenzen als die des  $S_1$ -Zustands gibt. Bei zeitaufgelösten FTIR-Messungen, die auf einer Mikrosekundenzeitskala an bR5.12 durchgeführt worden sind [Röd1999b], konnten nur sehr kleine Differenzsignale aufgezeichnet werden, als deren Ursache thermische Effekte ausgegeben werden. Dies kann man für die hier beobachteten Reaktionen aufgrund der 2,1 ps-Dynamik ausschließen. Nimmt man an, die Proteingerüstschwingungen (Amid I und Amid II) zeigen diese 2,1 ps-Dynamik, bedeutet dies, dass die Proteinumgebung des Chromophors nur durch das elektrische Feld der Anregungswelle beeinflusst wird. Eine Reaktion aufgrund einer Isomerisierung kann beim "geblockten Retinal" ausgeschlossen werden.

**Abbildung 4.28:**

Die Kinetiken bei 1552 und 1663  $\text{cm}^{-1}$  zeigen eine Bleichbandenentstehung, die deutlich verspätet gegenüber den Bleichbanden bei 1529 und 1635  $\text{cm}^{-1}$  ist. Die 1552  $\text{cm}^{-1}$ -Transiente hat Ähnlichkeit mit dem Zeitverhalten vom bR-Wildtyp im gleichen spektralen Bereich (Abbildung 4.15).

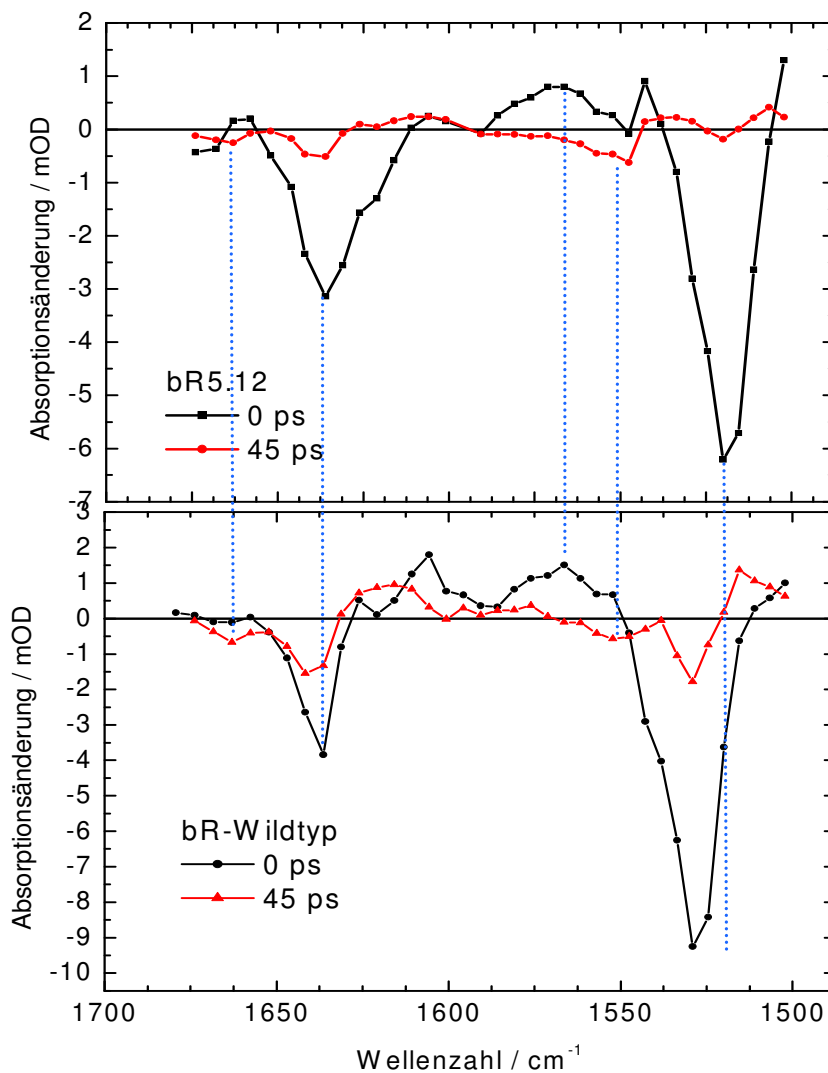
## 4.8.2 Der Vergleich von bR5.12 und bR-Wildtyp

Mit dem Vergleich der Spektren bei 0 und 45 ps können in einigen Spektralbereichen Analogien zwischen bR5.12 und bR-Wildtyp festgestellt werden.

Im 0 ps-Spektrum ist in beiden Proteinen bei 1570  $\text{cm}^{-1}$  die positive Absorption der C=C-Streckschwingung erkennbar. Durch das bR5.12 wird das Ergebnis, dass die  $S_1$ -Absorption bei 1570  $\text{cm}^{-1}$  liegt (Kapitel 4.8.1) für den Wildtyp bestätigt. Generell sind beide 0 ps-Spektren im positiven Teil äußerst wenig strukturiert. Die Erwartung, dass die  $S_1$ -Banden wie die Grundzustandsbanden Lorentz-förmig auftreten, kann nicht erfüllt werden. Vielmehr sind die  $S_1$ -Banden breit und eventuell weit verschoben, also außerhalb des beobachteten Spektralbereichs. Die 0- und 0,2 ps-Spektren im bR-Wildtyp ähneln dem des 0 ps-Spektrums von bR5.12. Dies wird als Hinweis gesehen, dass im  $S_1$ -Zustand vom bR-Wildtyp keine großen strukturellen Veränderungen stattfinden.

Das 45 ps-Spektrum von bR5.12 zeigt deutlich, dass es nach 45 ps Absorptionsdifferenzen gibt, die nicht mit 17 ps zerfallen sind. In dem Zeitbereich bis 150 ps sind keine Amplitudenveränderungen dieser Absorptionsdifferenzen gemessen worden. Dazu gehören vor allem die schon angesprochenen Absorptionsbanden bei 1552  $\text{cm}^{-1}$ . Da im Wildtyp bei 1550  $\text{cm}^{-1}$  ein ähnliches Absorptionsverhalten vorliegt wie im bR5.12, wird die Vermutung gestützt, dass die Ursache der Absorptionsdifferenzen die gleiche Reaktion des Proteingerüsts oder einer Aminosäure ist, unabhängig von der Isomerisierung. Das

elektrische Dipolfeld, welches durch die elektronische Anregung des Chromophors entsteht, beeinflusst die Ladungsverteilung in der Chromophorumgebung so, dass sich die Schwingungsübergänge von geladenen Aminosäuren oder die Biegeschwingung von Wassermolekülen verschieben. Dies führt zu einer irreversiblen Änderung im Protein.



**Abbildung 4.29:**

Vergleich von bR5.12 und bR-Wildtyp bei 0 und 45 ps. Es dominieren die Bleichsignale der C=C- und C=NH-Streckschwingung. Das Bleichsignal im bR5.12 ist zu 1520 cm<sup>-1</sup> verschoben. Im 0 ps-Spektrum ist bei 1570 cm<sup>-1</sup> die positive Absorption der C=C-Streckschwingung in beiden Proteinen erkennbar. Im 45 ps-Spektrum ist die nicht schwindende Restabsorption in den Bereichen bei 1550 und 1660 cm<sup>-1</sup> sichtbar.