

3 Theoretische Beschreibung der Doppelblitzexperimente

Im Folgenden wird die formale Beschreibung der Reaktionskinetik erster Ordnung dargestellt. Diese Beschreibung wird dann auf die Doppelblitzexperimente angewandt. Die daraus resultierenden Zusammenhänge werden später bei der Interpretation der Doppelblitzexperimente benötigt.

3.1 Reaktionskinetik erster Ordnung

Der erste Blitz im Doppelblitzexperiment trifft zunächst nur auf den Grundzustand bR, und bewirkt eine Bevölkung des ersten Intermediates K. Der thermische Zerfall von K, über die verschiedenen Intermediate des Photozyklus L, M, N und O zurück nach bR, wird durch ein lineares Differentialgleichungssystem erster Ordnung beschrieben. Dabei werden die Intermediatskonzentrationen im Folgenden in dem Spaltenvektor $\vec{I} = (K, L, M, N, O, bR)^T \equiv (I_1, I_2, \dots, I_n)^T$ zusammengefaßt. Das lineare DGL.-System kann dann folgendermaßen formuliert werden:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ \vdots \\ I_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_{11} & k_{21} & & k_{n1} \\ k_{12} & k_{22} & & \\ & & \ddots & \\ k_{1n} & & & k_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \\ \vdots \\ I_n \end{pmatrix} \Leftrightarrow \dot{\vec{I}} = \mathbf{K}\vec{I} \quad \text{Gl. 3.1}$$

Die Einträge k_{ij} der Ratenmatrix \mathbf{K} sind die mikroskopischen Raten für Übergänge vom Intermediat i zum Intermediat j , diese Größen legen das Reaktionsmodell fest. Zur Teilchenzahlerhaltung müssen die Spalteneinträge die folgende Nebenbedingung erfüllen:

$$k_{ii} = -\sum_{j \neq i} k_{ij} \quad \text{Gl. 3.2}$$

Außerdem muß für jeweils drei Intermediate die „Detailed Balance“ Bedingung (Onsager, 1931) gelten, nach der die Produkte der Übergangsraten von jeweils drei im Gleichgewicht stehenden Intermediaten folgende Nebenbedingung erfüllen müssen:

$$k_{ab}k_{bc}k_{ca} = k_{ac}k_{cb}k_{ba} \quad \text{Gl. 3.3}$$

Unter der Annahme, daß der erste Blitz den Teil ε_1 der Konzentration bR unmittelbar in das K Intermediat bringt, erhält man die Anfangsbedingung zu obigem DGL.-System:

$$\vec{I}(t=0) = (\varepsilon_1, 0, \dots, 0, 1 - \varepsilon_1)^T \quad \text{Gl. 3.4}$$

Die allgemeine Lösung der DGL. 3.1 erhält man (bei nicht entarteten Eigenwerten) durch eine Linearkombination der Eigenvektoren \vec{c}_{0i} der Ratenmatrix \mathbf{K} jeweils multipliziert mit einer Exponentialfunktion, die den Eigenwert $(-k_i)$ als Argument besitzt.

$$\vec{I}(t) = \sum_{i=1}^n b_i \vec{c}_{0i} e^{-k_i t} \quad \text{Gl. 3.5}$$

Dabei muß die Linearkombination b_i so bestimmt werden, daß die Anfangsbedingung Gl. 3.4 erfüllt ist. In Komponentenschreibweise kann dieser Zusammenhang auch folgenderweise ausgedrückt werden.

$$I_j(t) = \sum_{i=1}^n a_{ij} e^{-k_i t} \quad \text{Gl. 3.6}$$

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

3.2 Die überlagerte Kinetik der zweiten Anregung

Kommt nun der zweite Lichtblitz zur Zeit Δt hinzu, so tritt dieser prinzipiell mit allen Intermediaten der Konzentrationen $\bar{I}(\Delta t)$ einschließlich den noch im Grundzustand bR verbliebenen Molekülen in Wechselwirkung. Möchte man nun Photoreaktionen aus sämtlichen möglichen Intermediaten zulassen, so führt das zu einer unübersichtlichen Darstellung. Daher wird an dieser Stelle der Spezialfall eingeführt, daß nur ein Intermediat, sowie die noch im Grundzustand verbliebenen Moleküle mit dem Licht reagieren. Dies ist experimentell näherungsweise realisierbar, indem entweder die Wellenlänge des zweiten Lichtblitzes so gewählt wird, daß nur das k -te Intermediat sowie der Grundzustand anregbar ist, oder daß der Zeitabstand der beiden Blitze so gewählt wird, daß zur Zeit des zweiten Blitzes nur das k -te Intermediat und Grundzustand vorliegen.

Für die Zeit nach dem zweiten Blitz werden die Intermediatskonzentrationen mit \tilde{I} gekennzeichnet, wobei der Vektor \tilde{I} um die Anzahl q der durch die Photoreaktion aus dem k -ten Intermediat zusätzlich entstehenden Intermediate erweitert wird:

$$\tilde{I} = (I_1, I_2, \dots, I_n, I_{n+1}, \dots, I_{n+q})^T \quad \text{Gl. 3.7}$$

Außerdem wird der Nullpunkt der Zeitmessung für die geschlängelten Größen auf das Einsetzen des zweiten Blitzes gelegt. Mit diesen Definitionen kann nun die Wirkung des zweiten Blitzes als Anfangsbedingung für das erweiterte System Gl. 3.7 formuliert werden:

$$\tilde{I}(0) = \begin{pmatrix} I_1(\Delta t) & 0 & 0 \\ 0 & I_n(\Delta t) & 0 \\ 0 & 0 & I_k(\Delta t) \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ -I_n(\Delta t) g_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ -I_k(\Delta t) e_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ +I_k(\Delta t) e_2 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad \text{Gl. 3.8}$$

Der erste Term in Gl. 3.8 ist die durch den ersten Blitz erzeugte Besetzung zum Zeitpunkt des zweiten Blitzes. Durch den zweiten Blitz wird der g_2 -te Teil des Grundzustandes $\text{bR} \equiv I_n$ in das Intermediat $\text{K} \equiv I_1$ gebracht, dies berücksichtigt der zweite Term. Nach der Voraussetzung oben wird außerdem das k -te Intermediat vom zweiten Blitz angeregt, und zwar wird der e_2 -te Teil der Intermediatskonzentration I_k zugunsten des neuen $(n+1)$ -ten Intermediats erniedrigt, dies wird im dritten Term berücksichtigt. Die in das neue $(n+1)$ -te Intermediat gebrachten Moleküle werden im allgemeinen zu anderen neuen Intermediaten I_{n+2}, \dots, I_{n+q} zerfallen. Das diese Reaktion beschreibende DGl.-System muß damit auf folgende Form erweitert werden:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \tilde{I}_1 \\ \tilde{I}_2 \\ \tilde{I}_n \\ \tilde{I}_{n+1} \\ \tilde{I}_{n+q} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_{11} & k_{21} & & k_{n1} & k_{(n+1)1} & k_{(n+q)1} \\ k_{12} & k_{22} & & & & \\ k_{1n} & & & k_{nn} & k_{(n+1)n} & k_{(n+q)n} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_{(n+1)(n+1)} & k_{(n+q)n} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_{(n+1)(n+q)} & k_{(n+q)(n+q)} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{I}_1 \\ \tilde{I}_2 \\ \tilde{I}_n \\ \tilde{I}_{n+1} \\ \tilde{I}_{n+q} \end{pmatrix} \Leftrightarrow \tilde{\dot{I}} = \tilde{\mathbf{K}} \tilde{I} \quad \text{Gl. 3.9}$$

Darin beschreibt der abgegrenzte Teil links oben die Übergänge zwischen den ursprünglichen Intermediaten und bleibt natürlich unverändert. Die Einträge rechts unten

beschreiben Übergänge zwischen den neuen Intermediaten. Der Teil rechts oben beschreibt die Übergänge der neuen zu den alten Intermediaten. Wenn auch nach dem zweiten Blitz sämtliche Moleküle wieder zum Grundzustand zurückkehren, muß von diesen Einträgen mindestens eine Rate zur Rückgewinnung von bR von null verschieden sein. Übergänge der alten Intermediate zu den neuen sind ausgeschlossen, weil sie sonst schon im Gleichungssystem für den ersten Blitz auftauchen müßten, daher verschwinden die Einträge im Teil links unten. Dieses Gleichungssystem ist nun mit der oben aufgeführten Anfangsbedingung zu lösen. Die Erweiterung des Gleichungssystems um die q neuen Intermediate führt zu q zusätzlichen Eigenwerten, während die ursprünglichen Eigenwerte wegen der Diagonalform der Ratenmatrix erhalten bleiben. Die neuen Eigenwerte müssen dann in der Meßgröße auftauchen (z. B. in Gl. 2.9 oder Gl. 2.22). Dies ist z.B. der Fall bei der Photorückreaktion von $M \rightarrow \text{bR}$ (Kap. 5.3), dort tauchen zwei sehr schnelle Raten auf, die sich deutlich von den im Photozyklus vorhandenen unterscheiden.

Als weitere vereinfachende Annahme sollen nun die Übergänge der neuen Intermediate zu den alten ebenfalls verschwinden. Dies kann immer dadurch künstlich eingeführt werden, daß Intermediate zusätzlich in das untere Gleichungssystem eingefügt werden, z.B. sei nun das $(n+q)$ -te Intermediat identisch mit dem n -ten Intermediat, das für den Grundzustand steht. Dann zerfällt das DGL.-System in zwei ungekoppelte Systeme, die sich unabhängig voneinander lösen lassen:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \tilde{I}_1 \\ \tilde{I}_2 \\ \vdots \\ \tilde{I}_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_{11} & k_{21} & & k_{n1} \\ & k_{12} & k_{22} & \vdots \\ & \vdots & & \vdots \\ & & & k_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{I}_1 \\ \tilde{I}_2 \\ \vdots \\ \tilde{I}_n \end{pmatrix} \quad \begin{pmatrix} \tilde{I}_1(0) \\ \vdots \\ \tilde{I}_k(0) \\ \vdots \\ \tilde{I}_n(0) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_1(\Delta t) \\ \vdots \\ I_k(\Delta t) \\ \vdots \\ I_n(\Delta t) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} I_n(\Delta t)g_2 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ -I_n(\Delta t)g_2 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} - I_k(\Delta t)e_2$$

und

Gl.
3.10

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \tilde{I}_{n+1} \\ \tilde{I}_{n+2} \\ \vdots \\ \tilde{I}_{n+q} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_{11} & k_{21} & & k_{n1} \\ & k_{12} & k_{22} & \vdots \\ & \vdots & & \vdots \\ & & & k_{nn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \tilde{I}_{n+1} \\ \tilde{I}_{n+2} \\ \vdots \\ \tilde{I}_{n+q} \end{pmatrix} \quad \begin{pmatrix} \tilde{I}_{n+1}(0) \\ \tilde{I}_{n+2}(0) \\ \vdots \\ \tilde{I}_{n+q}(0) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_k(\Delta t)e_2 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix}$$

Das untere System beschreibt den Zerfall des, durch den zweiten Blitz durch Photoreaktion des k -ten Intermediats erzeugten, neuen $(n+1)$ -ten Intermediates, das sich durch neue Zeitkonstanten bemerkbar macht. Die Lösung hierfür sei $\tilde{I}_{ph}(t) = (\tilde{I}_{n+1}(t), \dots, \tilde{I}_{n+q}(t))^T$.

Die Anfangsbedingung des oberen Systems läßt sich als Summe von drei Anfangsbedingungen schreiben. Da es sich um ein lineares DGL.-System handelt, kann man die Lösung für die gesamte Anfangsbedingung als Summe der drei Lösungen der einzelnen Anfangsbedingungen schreiben. Die erste ist die Lösung $\tilde{I}_A(t)$ für die vom ersten Blitz erzeugte Konzentration die weiter den Zyklus durchläuft. Die zweite ist die Lösung für zusätzliche Anregung von Grundzustand $\tilde{I}_B(t)$ und die dritte Lösung $\tilde{I}_C(t)$ ist eine Zeitspur für eine negative Anfangsbesetzung des Intermediats, das vom zweiten Blitz zur Photoreaktion angeregt wurde.

Aus den Intermediatskonzentrationen folgen die Zeitspuren $U(t)$ und $\Delta A(t)$, die experimentell gemessen werden, nach Gl. 2.22 bzw. Gl. 2.7:

$$U(t) = \sum_{i=1}^n \Psi_i I_i(t) \text{ bzw. } \Delta A(\lambda, t) = d \sum_{i=1}^n (\varepsilon_i(\lambda) - \varepsilon_{bR}(\lambda)) c_i(t) \quad \text{Gl. 3.11}$$

Dabei ist über die vier oben beschriebenen Lösungen für die Konzentrationen zu summieren, so daß man z.B. für die Spannung des Doppelblitzexperiments erhält:

$$U_d(t) = \sum_{i=1}^n \Psi_i \tilde{I}_{A,i} + \sum_{i=1}^n \Psi_i \tilde{I}_{B,i} + \sum_{i=1}^n \Psi_i \tilde{I}_{C,i} + \sum_{i=n+1}^{n+q} \Psi_i \tilde{I}_{ph,i} \quad \text{Gl. 3.12}$$

Experimentell meßbar sind außer der Zeitspur des Doppelblitzexperiments auch die beiden Zeitspuren nach Anregung mit nur einem der beiden Laserblitze. Die Spannungszeitspur für die Lösung $\tilde{I}_A(t)$ ist dadurch meßbar, daß nur der erste Laser die Probe anregt, die Datenaufnahme aber erst um Δt verzögert einsetzt. Die Spannungszeitspur für die Lösung $\tilde{I}_B(t)$ resultiert aus der zusätzlichen Anregung von Grundzustand durch den zweiten Blitz. Diese Zeitspur sollte wegen der vorausgesetzten Linearität des Reaktionsmodells dieselbe Form haben wie bei Anregung durch den zweiten Blitz alleine, ohne vorhergehenden ersten Blitz. Dann ist jedoch ist die Amplitude um den Faktor $f_1 = 1 - \varepsilon_1$ der nach dem ersten Blitz noch im Grundzustand verbliebenen Moleküle reduziert.

$$U_1(t) = \sum_{i=1}^n \Psi_i \tilde{I}_{A,i} \quad \text{und} \quad f_1 U_2(t) = \sum_{i=1}^n \Psi_i \tilde{I}_{B,i} \quad \text{Gl. 3.13}$$

Zieht man nun vom Doppelblitzexperiment diese beiden Zeitspuren ab, so erhält man als Lösung die Überlagerung der beiden anderen Zeitspuren, die der Photoreaktion des Intermediates $\tilde{I}_{ph}(t)$ und die der geänderten Photozykluskinetik mit negativer Anfangsbesetzung $\tilde{I}_C(t)$.

$$\begin{aligned} U_{ph}(t) + U_C(t) &= \sum_{i=1}^n \Psi_i \tilde{I}_{C,i} + \sum_{i=n+1}^{n+q} \Psi_i \tilde{I}_{ph,i} \\ &= U_d(t) - \sum_{i=1}^n \Psi_i \tilde{I}_{A,i} - \sum_{i=n+1}^{n+q} \Psi_i \tilde{I}_{B,i} = U_d(t) - U_1(t) - f_1 U_2(t) \end{aligned} \quad \text{Gl. 3.14}$$

In der Auswertung der Doppelblitzexperimente wird immer wieder diese Differenz gebildet und zur Interpretation herangezogen. Betrachtet man den einfachen Spezialfall, daß die Photoreaktion sehr schnell zum Grundzustand zurückführt, dann sollte man eine schnelle Komponente für das Rückkehren der Spannung und eine langsame Komponente für den Zerfall der negativen Anfangsbedingung erhalten, da die Photoreaktion und der Zerfall des Intermediates weit voneinander getrennte Zeitkonstanten haben (siehe L und M Rückreaktion). Bei den elektrischen Experimenten führt die Aufladung der Membran zu einer Abweichung von diesem Verhalten (Abb. 5.11). Bei optischen Messungen der Photorückreaktion von M kann man jedoch die schnelle Rückkehr in den Grundzustand und einige Zeitdekaden später den Zerfall der negativen Anfangsbesetzung deutlich getrennt beobachten (Abb. 5.6).

Findet die Photoreaktion des Intermediates jedoch über mehrere Intermediate statt und mit Zeiten die ähnlich denen im Photozyklus sind, so sind die beiden überlagerten Prozesse (Photoreaktion und Zerfall der negativen Anfangsbedingung) nicht mehr deutlich zu trennen. In diesem Fall wird versucht die Daten durch Interpretation wenigstens qualitativ zu verstehen (siehe Photoreaktion von N und O). Im Einzelfall könnte hier auch die Simulation von speziellen Reaktionsmodellen für die Photoreaktion und den normalen thermischen Zerfall im Photozyklus durchgeführt werden, wie es zum Beispiel bei Doppelblitzexperimenten an Phytochrom praktiziert wurde (Scurlock et al., 1993). Bei Bacteriorhodopsin ist dies jedoch schwierig, da der Photozyklus des ersten Blitzes bereits sehr schwierig zu modellieren ist, da viele verschiedene Reaktionsmechanismen ähnlich gute Anpassungen an die Meßdaten

erlauben. Die Doppelblitzexperimente der L und M Rückreaktion stellen jedoch eine zusätzliche Bedingung an das Reaktionsmodell dar, die es möglicherweise erlaubt, dem einen oder anderen Modell den Vorzug zu geben.

