

Kapitel 8

Die späten Photozyklusintermediate

8.1 Experimente unter alkalischen Bedingungen: Das N-Intermediat

Information über das N-Intermediat ist aus Experimenten unter Standardbedingungen kaum zu gewinnen, da das N-Intermediat nur schwach akkumuliert und außerdem vom O-Intermediat überlagert ist. Deswegen wurden zeitaufgelöste Messungen unter extrem alkalischen Bedingungen (pH10.4) durchgeführt. Das N-Intermediat wird dann stark akkumuliert, während das O-Intermediat spektroskopisch nicht mehr nachzuweisen ist. Allerdings ist der Photozyklus im hinteren Teil dadurch derart verlangsamt, daß Meßzeiten von 10s (bei $T = 20^\circ\text{C}$) erforderlich waren, und außerdem die Meßlichtintensität im Wellenlängenbereich von 543nm bis 635nm auf etwa 20% reduziert werden mußte. Die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ wurde bei 13 Wellenlängen (390nm bis 670nm) und drei Polarisationswinkeln ($\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$), gemittelt über jeweils 30 Einzelblitze, gemessen. Zusätzliche Messungen erfolgten für vier Wellenlängen (490nm , 520nm , 543nm und 570nm) bei acht Polarisationswinkeln ($\theta = -20^\circ, 0^\circ, 20^\circ, 40^\circ, 50^\circ, 70^\circ, 90^\circ, 110^\circ$). Aus dem Datenfeld $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ ergeben sich mit Hilfe von Gl.(4.10) durch Anpassung (bei acht Polarisationswinkeln) bzw. analytisch (bei nur drei Polarisationswinkeln) die Zeitspuren der Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, des transienten Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und der transienten Doppelbrechungsänderung $\Delta \Delta n(\lambda, t)$. Zusammen mit der transienten Anisotropie $R(\lambda, t)$ sind diese Zeitspuren für sechs ausgewählte Wellenlängen in Abb. 8.1 dargestellt.

Die Absorptionsänderung (Abb. 8.1a) und der transiente Lineardichroismus (Abb. 8.1b) zeigen deutlich den beschleunigten M-Aufbau – bei etwa $200\mu\text{s}$ hat M seine maximale Akkumulation – und den verlangsamt multiexponentiellen M-Zerfall, in den das N-Intermediat involviert ist. Dieses charakteristische Verhalten bei hohem pH-Wert ist plausibel, denn der M-Aufbau ist mit der Deprotonierung der SB verbunden, während der M-Zerfall mit der Reprotonierung der SB einhergeht. Das L-Intermediat wird bei diesen Bedingungen offenbar nur schwach akkumuliert, da die Absorptionsänderung bei 490nm (Abb. 8.1a, Zeitspur II) im μs -Zeitbereich keine positiven Werte erreicht.

Die Anisotropiezeitspuren für $\lambda \geq 490\text{nm}$ (Abb. 8.1c) erreichen zum Zeitpunkt der maximalen M-Akkumulation nahezu den gleichen Wert ($R(\lambda, 200\mu\text{s}) \approx -0.147$) und laufen dann aber systematisch auseinander. Die Beziehung

$$-0.147 > R(590\text{nm}, t) > R(570\text{nm}, t) > R(543\text{nm}, t) > R(520\text{nm}, t) > R(490\text{nm}, t)$$

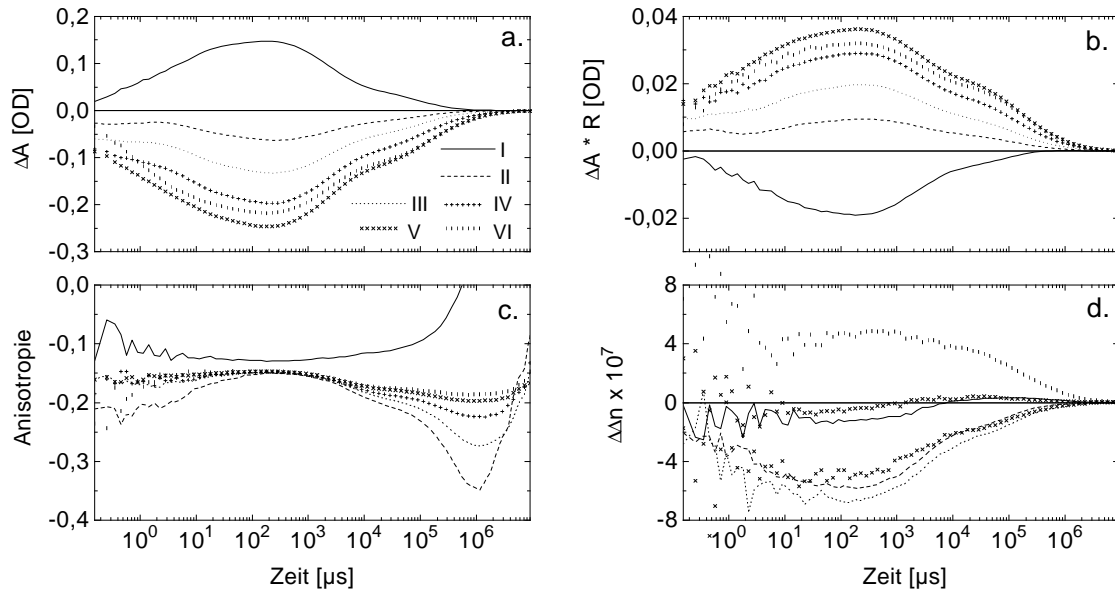


Abbildung 8.1: Ergebnis der Anpassung des Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Gl.(4.10) für sechs ausgewählte Wellenlängen. I: 410nm, II: 490nm, III: 520nm, IV: 543nm, V: 570nm, VI: 590nm. (a) (isotrope) Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, (b) transienter Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$, (c) transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$, (d) transiente Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$.

für den Zeitbereich von $t = 1ms$ bis $t = 1s$ deutet darauf hin, daß ein Intermediat (N) transient besetzt wird, dessen Anisotropie vom Betrage deutlich kleiner ist als die des bR-Grundzustandes. Die Anisotropiezeitspur für $\lambda = 410nm$ verläuft über den ganzen Zeitbereich oberhalb und deutlich abgesetzt von den anderen Kurven. Der Wert bei maximaler M-Akkumulation ($R(410nm, 200\mu s) \approx -0.13$) weist, wie bei allen bisher diskutierten Messungen, auf eine gegenüber dem bR-Grundzustand betragsmäßig kleinere Anisotropie hin. Die transienten Doppelbrechungsänderungen (Abb. 8.1d) zeigen überraschenderweise im M-Zerfall ein anderes kinetisches Verhalten als die Absorptionsänderungen. Dies wird deutlicher bei der Betrachtung der spektralen Abhängigkeit der linearen Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ im Vergleich mit den Berechnungen nach der Kramers-Kronig-Relation Gl.(4.14) aus dem Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ für diskrete Zeitpunkte (Abb. 8.2).

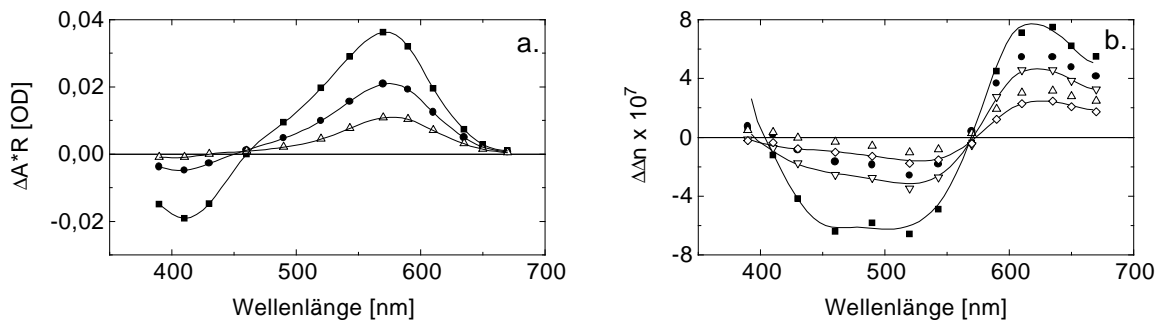


Abbildung 8.2: Spektrale Abhängigkeit (a) des Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und (b) der Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ für $t = 180\mu s$ (■), $t = 18ms$ (●) und $t = 180ms$ (Δ). Symbole: Datenpunkte, — in (a): Splinesfits an die Datenpunkte, — in (b): Berechnung mit der Kramers-Kronig-Relation Gl. (4.14) aus den Splinesfits von (a), ▽ in (b): $\Delta\Delta n(\lambda, 18ms) - 9 \cdot 10^{-8}$, ◇ in (b): $\Delta\Delta n(\lambda, 180ms) - 7 \cdot 10^{-8}$.

Während für $t = 180\mu s$ noch gute Übereinstimmung besteht, treten für $t = 18ms$ und $180ms$ systematische Abweichungen auf. Für diese Zeitpunkte läßt sich aber wieder gute Übereinstimmung erzielen, indem die Datenpunkte um einen konstanten Wert (ca. $-9 \cdot 10^{-8}$ für $t = 18ms$ bzw. $-7 \cdot 10^{-8}$ für $t = 180ms$) verschoben werden (Abb. 8.2b). Offenbar gibt es in der Doppelbrechungsänderung einen Beitrag, der nicht im Zusammenhang mit Änderungen in der Umgebung des Chromophors steht. Da keine systematische Abhängigkeit dieses Beitrags von der Wellenlänge festzustellen war, wurde die Abweichung für weitere diskrete Zeitpunkte über einen Wellenlängenbereich von $410nm$ bis $670nm$ gemittelt. Das Ergebnis ist in Abhängigkeit von der Zeit in Abb. 8.3 dargestellt, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen angeben. Der zeitliche Verlauf läßt sich mit zwei Exponentialfunktionen

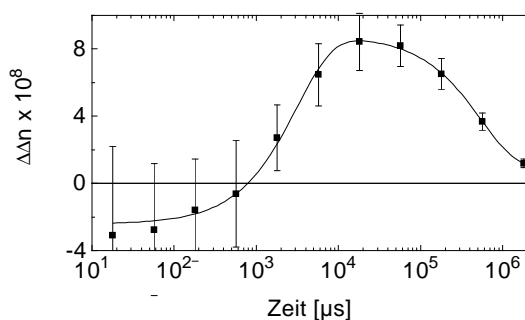


Abbildung 8.3: Zeitlicher Verlauf der Differenz zwischen der gemessenen und der nach Gl. (4.14) berechneten Doppelbrechungsänderung gemittelt über einen Spektralbereich von $410nm$ bis $670nm$. Fehlerbalken: Standardabweichungen, — : Anpassung mit zwei Exponentialfunktionen ($\tau_1 \approx 3ms$, $\tau_2 \approx 500ms$).

($\tau_1 \approx 3ms$, $\tau_2 \approx 500ms$) anpassen. Der von null verschiedene Anfangswert ist vermutlich ein systematischer Fehler, denn die transienten Phasenänderungen $\Delta\phi_E(\lambda, t)$ und damit auch die Doppelbrechungsänderungen hängen nach Gl. (4.10) stets von den permanenten Phasendifferenzen $\Delta\phi_E(\lambda)$ ab, die aus der Gleichlichtmessung nicht mit derart hoher Genauigkeit bestimmt werden können. Für die frühen Zeitpunkte liegt die Nulllinie auch innerhalb der Standardabweichung. Der weitere zeitliche Verlauf mit einem Maximum bei ca. $20ms$ ist aber weder durch systematische noch durch zufällige Fehler als Artefakt zu bewerten. Bei $610nm$ und $18ms$ ist der relative Beitrag zur gemessenen Doppelbrechungsänderung immerhin 20%.

Dieser Effekt tritt aber offenbar nur unter stark alkalischen Bedingungen auf. Die Meßdaten der Experimente an Wildtyp und D96A bei neutralem bzw. saurem pH-Wert wurden daraufhin analysiert und zeigten im M-Zerfall keine signifikanten Abweichungen bezüglich des berechneten Chromophorbeitrages zur Doppelbrechungsänderung. Da der M-Zustand bei der Mutante D96N¹ strukturell ähnlich sein soll wie der N-Zustand bei Wildtyp [Sas97], kann diese Strukturänderung (bezüglich des bR-Grundzustandes) nicht die Ursache der hier beobachteten Doppelbrechungsänderung sein.

Nichtlineare Effekte, wie der Kerr-Effekt oder der Pockels-Effekt, aufgrund von Ladungverschiebungen außerhalb der Chromophorumgebung sind prinzipiell nicht auszuschließen. Im Photozyklus von bR können Potentialdifferenzen von $20 - 40mV$ über Abstände von etwa $1nm$ auftreten², die möglicherweise nicht in Wechselwirkung mit der Chromophorumgebung stehen. Da Kerr-Konstanten typischerweise zwischen $5 \cdot 10^{-12} cm/V^2$ (Wasser)

¹Diese Mutante hat die gleichen funktionellen und photochemischen Eigenschaften wie D96A

²Daraus ergeben sich Feldstärken von $2 - 4 \cdot 10^5 V/cm$.

und $5 \cdot 10^{-10} \text{ cm/V}^2$ (Nitrobenzol) liegen, kann die beobachtete Doppelbrechungsänderung, umgerechnet auf etwa ein Viertel des Membranvolumens, nicht durch den Kerr-Effekt bedingt sein. Selbst mit einer hohen Kerr-Konstante ergäbe sich ein um gut drei Zehnerpotenzen kleinerer Wert für die Doppelbrechungsänderung. Beim Kerr-Effekt ist der Doppelbrechungsbeitrag außerdem proportional zur Wellenlänge, während die hier gefundenen Abweichungen keine signifikante Abhängigkeit von der Wellenlänge zeigten. Der Pockels-Effekt, der linear vom elektrischen Feld abhängt, kommt von der Größenordnung her eher in Frage. Die intrinsische Doppelbrechung der Membranen müßte durch die hohe Feldstärke um bis zu 10% beeinflussbar sein. Eine eindeutige Erklärung des beobachteten Phänomens kann jedoch nicht gegeben werden.

Für die weitere Auswertung werden nur die Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ verwendet. Die aus beiden Größen resultierenden Anisotropiezeitspuren $R(\lambda, t)$ geben jedoch eine anschaulichere Interpretation und dienen schließlich als empfindlicher Monitor zur Beurteilung des gefundenen Ergebnisses. Eine konsistente Auswertung der Meßdaten erfordert die Voraussetzung, daß zum Zeitpunkt maximaler M-Akkumulation ($t \approx 200\mu\text{s}$) neben M kein weiteres Intermediat vorliegt³, was bei hohem pH-Wert durchaus plausibel ist. Daraus ergibt sich die Konsequenz, daß das Grundzustandsspektrum für $\lambda \geq 490\text{nm}$ durch $\vec{A}_{bR} = -\Delta A(\lambda, 200\mu\text{s})/\eta$ festgelegt ist. Hierbei wurden systematische Abweichungen zu dem durch die Gleichlichtmessung bestimmten Grundzustandsspektrum gefunden. Diese Abweichungen sind z.T. dadurch bedingt, daß die PM unter alkalischen Bedingungen nicht mehr in dem Maße photostabil sind, wie bei neutralem pH-Wert. Durch die ständig wiederholte Lichtadaptation bei jeder Wellenlänge und jedem Polarisationswinkel war am Ende der Gleichlichtmessung ein Chromophorverlust von fast 5% zu beobachten. Im kurzwelligen Spektralbereich ergaben sich nach der üblichen Streukorrektur deutlich größere Absorptionswerte als bei den Proben mit neutralem pH-Wert. Möglicherweise repräsentiert das Grundzustandsspektrum unter alkalischen Bedingungen ein heterogenes Zustandsgemisch, von dem aber nur ein spezifischer Zustand mit grünem Licht effizient angeregt werden kann. Das Auswertungsverfahren nach Lösungsansatz I (siehe Kap. 4.2.2), das sich für die frühen Intermediate als zweckmäßig erwiesen hatte, läßt für die späten Intermediate keinen Erfolg erwarten. Die Konstruktion von asymptotischen Differenzspektren ist wegen des multiexponentiellen M-Zerfalls – für eine Anpassung der zeitlichen Entwicklung dieses Prozesses sind fünf Exponentialfunktionen notwendig – vieldeutig, und außerdem verliert die Erhaltungsbedingung Gl.(4.41) ihre Gültigkeit. Daher wurde nach Lösungsansatz II (siehe Kap. 4.2.5) vorgegangen. Um diesen anwenden zu können, wurden die Matrizen $\Delta \mathbf{A}$ und $\Delta \mathbf{AR}$ auf einen Wellenlängenbereich reduziert, in dem das M-Intermediat nicht absorbiert, und außerdem glatte Anisotropieverläufe im M-Zerfall vorliegen. Dieses Kriterium ist für die fünf Wellenlängen – 490nm, 520nm, 543nm, 570nm und 590nm – gegeben (siehe Abb. 8.1). Um die Einflüsse der frühen Intermediate zu eliminieren wurde der Zeitbereich von $t = 180\mu\text{s}$ bis $t = 1.1\text{s}$ eingegrenzt. Auf der reduzierten logarithmischen Zeitskala entspricht dies 39 Zeitpunkten. Da die Anisotropiewerte bei 490nm, 520nm und 543nm zum Zeitpunkt maximaler M-Akkumulation $t \approx 200\mu\text{s}$ zwar nahezu aber nicht exakt den gleichen Wert wie bei 570nm und 543nm erreichten, wurden die zugehörigen Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ nachkorrigiert, so daß bei allen fünf Wellenlängen zur Zeit $t = 180\mu\text{s}$ der gleiche Anisotropiewert ($R(\lambda, 180\mu\text{s}) = -0.1470$) durchlaufen wird. Diese Korrektur beträgt aber weniger

³Ein Beitrag des L-Intermediates im späten Teil des Photozyklus würde die Bestimmung des N-Spektrums und der N-Anisotropie erheblich erschweren, denn die Intermediate L und N sind vermutlich spektral nur wenig gegeneinander verschoben und haben ähnliche Anisotropiewerte

als 2%.

Die reduzierten Datenfelder $\Delta\mathbf{A}$ und $\Delta\mathbf{AR}$ wurden nun wieder zu einer Matrix $(\Delta\mathbf{A}, \Delta\mathbf{AR})^T$ kombiniert und mit SVD zerlegt. Aus den Singulärwerten $s = \{1.5757, 0.0664, 0.0044, \dots\}$ wurde gefolgert, daß nur zwei Basisspektren relevant sind. Unter Berücksichtigung dieser Basisspektren hat die Matrix $\Delta\mathbf{AR}(\Delta\mathbf{A}^{-1}) = \mathbf{S}^R\mathbf{S}^{-1}$ (siehe Kap. 4.2.5) die Eigenwerte $r_1 = -0.1486$ und $r_2 = -0.1238$. Da der erste Eigenwert sehr dicht bei dem Anisotropiewert zum Zeitpunkt maximaler M-Akkumulation liegt ($R(\lambda, 180\mu s) = -0.147$), entspricht dieser Eigenwert offenbar der Grundzustandsanisotropie ($r_1 \equiv r_{bR}$), während der zweite Eigenwert der Anisotropie des N-Intermediates zuzuordnen ist ($r_2 \equiv r_N$). Die zugehörigen auf die Länge 1 normierten Eigenvektoren sind in der Einheit OD :

$$\vec{A}_{bR}^* = \begin{pmatrix} 0.156 \\ 0.325 \\ 0.483 \\ 0.599 \\ 0.528 \end{pmatrix} \quad \text{und} \quad \vec{A}_N^* = \begin{pmatrix} 0.183 \\ 0.374 \\ 0.512 \\ 0.580 \\ 0.477 \end{pmatrix}$$

Beide Zustände haben also ihr Absorptionsmaximum bei $570nm$ (vierte Zeile des Vektors), das N-Intermediat ist jedoch geringfügig blauverschoben (siehe Abb. 8.4). Der Eigenvektor des Grundzustandes \vec{A}_{bR}^* läßt sich fast exakt auf die Absorptionswerte skalieren, die aus der Absorptionsänderung bei $180\mu s$ mit einem einheitlichen Faktor η hervorgegangen waren. Zur Berechnung der Zeitspuren wird \vec{A}_{bR}^* (willkürlich) so skaliert, daß der Absorptionswert bei $570nm$ dem Gleichlichtwert entspricht. Die Anregungseffizienz η wäre demnach 0.3. \vec{A}_N^* bleibt zunächst auf 1 normiert. Mit den so skalierten Eigenvektoren und den zugehörigen Eigenwerten ergeben sich nach Gl.(4.66) bzw. Gl.(4.67) die Konzentrationen der Intermediate N und M, die in Abb. 8.4c dargestellt sind. Die geringen Abweichungen zwischen beiden Berechnungen zeigen, daß der Lösungsraum der Eigenwertgleichung mit den gemessenen Daten verträglich ist. Der zeitliche Verlauf der relativen N-Konzentration im vordersten Zeitbereich ($t \leq 500\mu s$) ist natürlich unphysikalisch und deutet darauf hin, daß in diesem Zeitbereich noch der Zerfall eines anderen Intermediates, etwa des L-Intermediates, überlagert ist. Die Konzentrationssumme von N und M bleibt bis etwa $30ms$ nahezu konstant. Mit den Intermediatskonzentrationen lassen sich nach Gl.(4.68) die vollständigen Intermediatsspektren von N und M berechnen (Abb. 8.4a). Für A_{bR} wurde dabei das aus $-\Delta A(\lambda, 180\mu s)/\eta$ bestimmte Spektrum verwendet, das aber im kurzwelligen Spektralbereich ($\lambda < 490nm$) durch die Absorptionswerte aus der Gleichlichtmessung ergänzt wurde. Das aus der Gleichlichtmessung bestimmte Grundzustandsspektrum hat offenbar eine größere spektrale Breite (siehe Abb. 8.4a), was aber durch die oben erwähnte Heterogenität bedingt sein kann. Die Absorptionswerte des M-Intermediates sind durch die vermutlich fehlerbehafteten Grundzustandswerte und die willkürlich gewählte Anregungseffizienz beeinflusst, stimmen aber qualitativ mit den M-Spektren von D96A (siehe Kap. 7.3) überein. Die wellenlängenabhängige Anisotropie der Intermediate, berechnet nach Gl.(4.69) bzw. Gl.(4.71), streut nur wenig um die jeweiligen gewichteten Mittelwerte, die aus Gl.(4.70) bzw. Gl.(4.72) hervorgehen (Abb. 8.4b). Der Mittelwert für das N-Intermediat (\bar{r}_N) ist identisch mit dem oben angegebenen Eigenwert, für den Mittelwert des bR-Grundzustandes ergibt sich eine geringfügige Abweichung ($\bar{r}_{bR} = -0.1474 \pm 0.0003$). Der Mittelwert für das M-Intermediat beträgt $\bar{r}_M = -0.1337 \pm 0.0013$. Die Intermediatsanisotropien als zeitabhängige Größen sind in Abb. 8.4d dargestellt. Die Anisotropie des M-Intermediates bleibt bis etwa $10ms$ auf dem konstanten Wert \bar{r}_M und divergiert im Bereich verschwindender

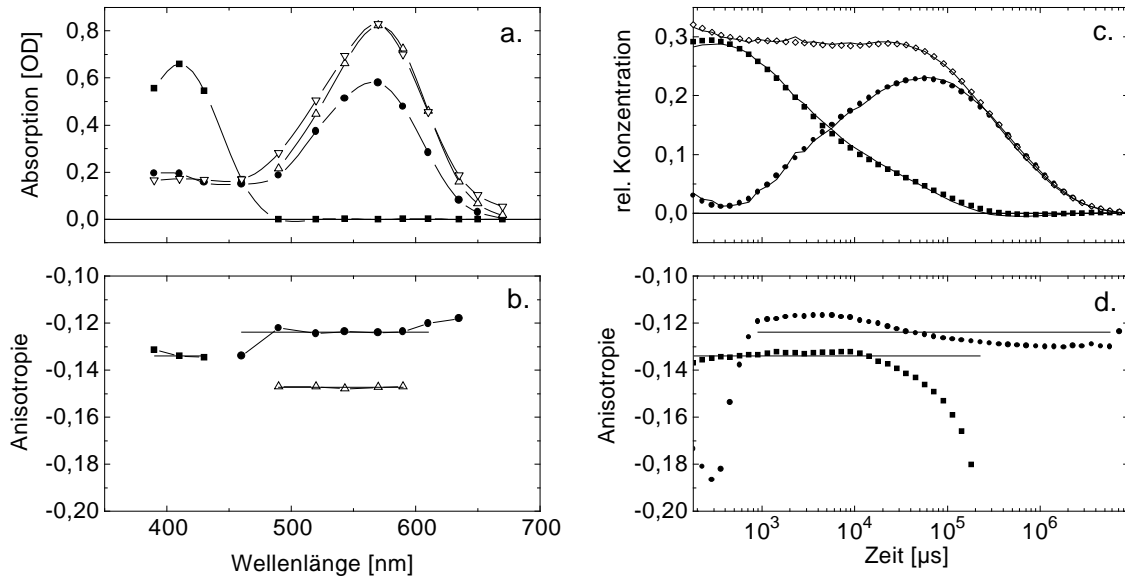


Abbildung 8.4: Ergebnis der Auswertung für $|\vec{A}_N^*| = 1$: (a) Intermediatspektren \mathbf{A} , (b) Wellenlängenabhängigkeit der Intermediatsanisotropien, Symbole: $(r_i)_\lambda$, — \bar{r}_i , (c) zeitlicher Verlauf der Intermediate, Symbole: Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)$ nach Gl.(4.39), — : Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ nach Gl.(4.40), (d) zeitlicher Verlauf der Intermediatsanisotropien, Symbole: $r_i(t)$, — \bar{r}_i . ■ : M, ● : N, △ : bR (aus den transienten Daten), ▽ in (a): bR-Spektrum aus der Gleichlichtmessung, ◇ in (c): Konzentrationssumme von M und N.

M-Konzentration. Die Anisotropie von N verläuft im Zeitbereich von etwa 1ms bis 10ms oberhalb von \bar{r}_N auf einem konstanten Wert und konvergiert dann aber gegen einen Wert unterhalb von \bar{r}_N . Dieses Verhalten wird weiter unten noch näher analysiert.

Zunächst wird noch der Einfluß der Skalierung des Eigenvektor \vec{A}_N^* betrachtet. In Abb. 8.5 sind die Intermediatspektren und die zugehörigen Konzentrationsverläufe für die Skalierung $f := |\vec{A}_N^*| = 1.0$ und für $f = 1.2$ verglichen. Das Spektrum von N skaliert natürlich nur in dem Spektralbereich linear, in dem das M-Intermediat nicht absorbiert. Größere Skalierungsfaktoren bewirken, daß die Absorptionen von N im kurzwelligen Spektralbereich kleiner werden. Da diese Absorptionen für den Skalierungsfaktor $f = 1.2$ schon erheblich kleiner sind als die des bR-Grundzustandes, wird die obere Grenze für f in diesem Bereich liegen. Das Spektrum des M-Intermediates ist unabhängig vom Skalierungsfaktor. Bei den Konzentrationsverläufen (Abb. 8.5b) bewirkt eine Vergrößerung des Skalierungsfaktors f , daß die relative Konzentration von N herunterskaliert wird, während M eine Zunahme erfährt. Aus den Verläufen ist zu erkennen, daß $f = 1.0$ eine untere Grenze sein muß, denn sonst würde die Konzentration von M für $t > 100\text{ms}$ negativ. Die Gesamtkonzentration von N und M hängt nicht vom Skalierungsfaktor ab. Dies ist leicht zu zeigen, indem eine Transformationsmatrix \mathbf{F} für die Skalierung des N-Spektrums aufgestellt wird:

$$\mathbf{F} = \begin{pmatrix} 1 & (1-f) \\ 0 & f \end{pmatrix} \Leftrightarrow \mathbf{F}^{-1} = \begin{pmatrix} 1 & (1-\frac{1}{f}) \\ 0 & \frac{1}{f} \end{pmatrix}$$

Aus der Beziehung

$$\Delta \mathbf{A} = (\mathbf{A} - \mathbf{A}_{bR}) \mathbf{F} \mathbf{F}^{-1} \mathbf{n}$$

ist abzulesen, daß \mathbf{n} entsprechend mit der Inversen \mathbf{F}^{-1} zu transformieren ist. Daraus ergibt sich die Invarianz der Gesamtkonzentration. Das bedeutet allerdings, daß die Gesamtkon-

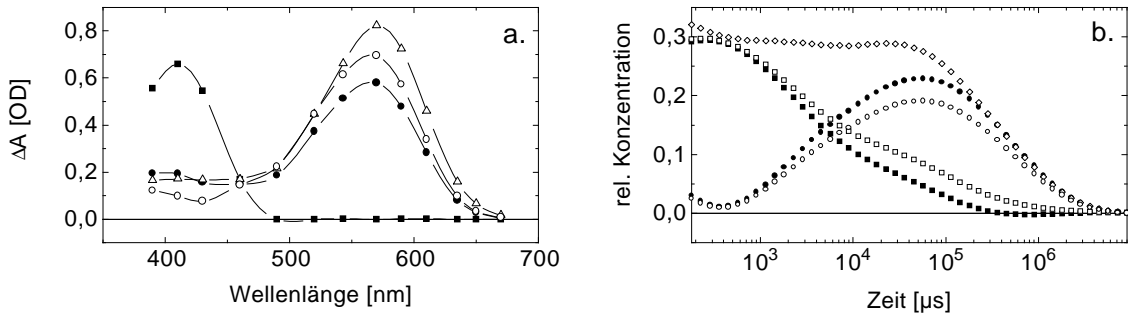


Abbildung 8.5: Einfluß der Skalierung des Eigenvektors $f := |\vec{A}_N^*|$ auf die Intermediatspektren (a) und ihren zeitlichen Verlauf (b). ■ : M für $f = 1.0$, ● : N für $f = 1.0$, □ : M für $f = 1.2$, ○ : N für $f = 1.2$, △ : bR (aus den transienten Daten), ◇ in (b): Konzentrationssumme von M und N.

zentration keine weitere Einschränkung für den Skalierungsbereich liefert.

Die formalen Ansätze, mit denen die Daten analysiert wurden, hatten implizit nur einen N-Zustand zugelassen. Die Berücksichtigung eines dritten Basisspektrums in \mathbf{S} bzw. \mathbf{S}^R hatte bei der Eigenwertberechnung kein physikalisch sinnvolles Ergebnis geliefert. Der zeitliche Verlauf der Anisotropie des N-Intermediates (Abb. 8.4d) suggeriert aber einen Übergang zwischen zwei Subzuständen des N-Intermediates, die unterschiedliche Anisotropien haben. Dazu wird der folgende Ansatz für die zeitabhängige N-Anisotropie gewählt, wobei r_{N_1} und r_{N_2} nun zeitunabhängige Größen sein sollen:

$$r_N(t) = \frac{r_{N_1}n_{N_1}(t) + r_{N_2}n_{N_2}(t)}{n_{N_1}(t) + n_{N_2}(t)}$$

Als Nebenbedingung muß $n_{N_1}(t) + n_{N_2}(t) = n_N(t)$ erfüllt sein. Dadurch kann eine der beiden Konzentrationen $n_{N_1}(t)$ oder $n_{N_2}(t)$ eliminiert werden, und es ergibt sich:

$$n_{N_1}(t) = \frac{n_N(t)(r_N(t) - r_{N_2})}{r_{N_1} - r_{N_2}}$$

Die Anisotropien r_{N_1} und r_{N_2} sind nun so zu wählen, daß keine der beiden Teilkonzentrationen $n_{N_1}(t)$ und $n_{N_2}(t)$ negative Werte annimmt. Der Zeitbereich unter $800\mu\text{s}$ ist dabei wegen der oben diskutierten Artefakte außer acht zu lassen. Für r_{N_1} ergibt sich eine untere Grenze von -0.117 , während r_{N_2} nach oben (-0.130) beschränkt ist. Innerhalb dieser Grenzen

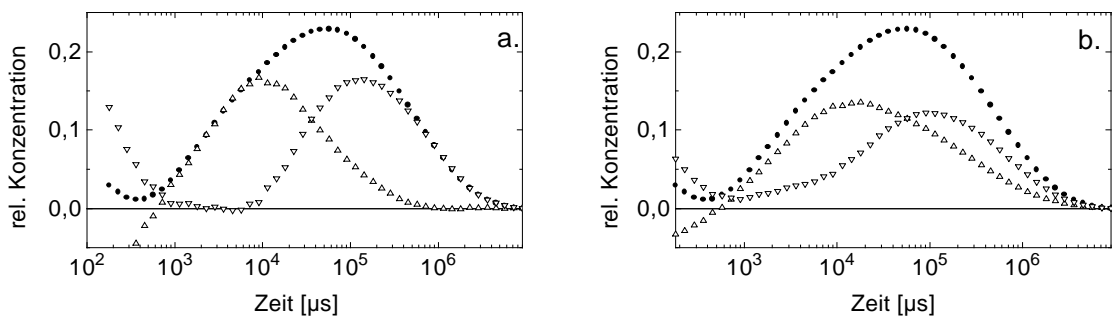


Abbildung 8.6: Konzentrationsverläufe der beiden Subzustände N_1 und N_2 für $r_{N_1} = -0.117$ und $r_{N_2} = -0.130$ (a), für $r_{N_1} = -0.110$ und $r_{N_2} = -0.140$ (b). ● : N, △ : N_1 , ▽ : N_2 .

ist rein mathematisch jede beliebige Kombination möglich. In Abb. 8.6 sind die zeitlichen Verläufe für zwei Kombinationen dargestellt. Wenn für beide Anisotropien die Grenzwerte gewählt werden (Abb. 8.6a), dann steigt die Konzentration von N_2 erst an, wenn N_1 bereits wieder zerfällt. Die Subzustände erreichen gleiche Akkumulation. Dagegen sind die beiden Subzustände für andere Kombinationen (r_{N_1}, r_{N_2}) im ganzen betrachteten Zeitbereich überlagert (Abb. 8.6b) und werden schwächer akkumuliert. Ein kinetisches Modell läßt sich aber aus keiner Kombination ableiten.

Um zu zeigen, daß die gemessenen Daten zwei N–Subzustände mit unterschiedlichen Anisotropien erfordern, wurden die Zeitspuren der Absorptionsänderung und des transienten Lineardichroismus nach Gl.(4.37) bzw. Gl.(4.38) rekonstruiert und daraus die Anisotropiezeitspuren gebildet. Im einen Fall wurde nur ein N–Zustand mit der mittleren Anisotropie $r_N = -0.1238$ verwendet, im anderen Fall wurden zwei N–Zustände mit gleichem Spektrum aber unterschiedlichen Anisotropien ($r_{N_1} = -0.117$ und $r_{N_2} = -0.130$) angesetzt. Die Wahl der Anisotropien der Zustände N_1 und N_2 hat keinen Einfluß auf die Zeitspuren der transienten Anisotropie $R(\lambda, t)$, da für jede Kombination die zugehörigen Zeitspuren $n_{N_1}(t)$ und $n_{N_2}(t)$ neu zu berechnen sind. Das Ergebnis beider Berechnungen ist in Abb. 8.7 für die fünf Wellenlängen dargestellt, die zur Bestimmung der Konzentrationsverläufe verwendet wurden. Während bei $490nm$ (Abb. 8.7a) der Ansatz mit den zwei N–Zuständen nur bis etwa

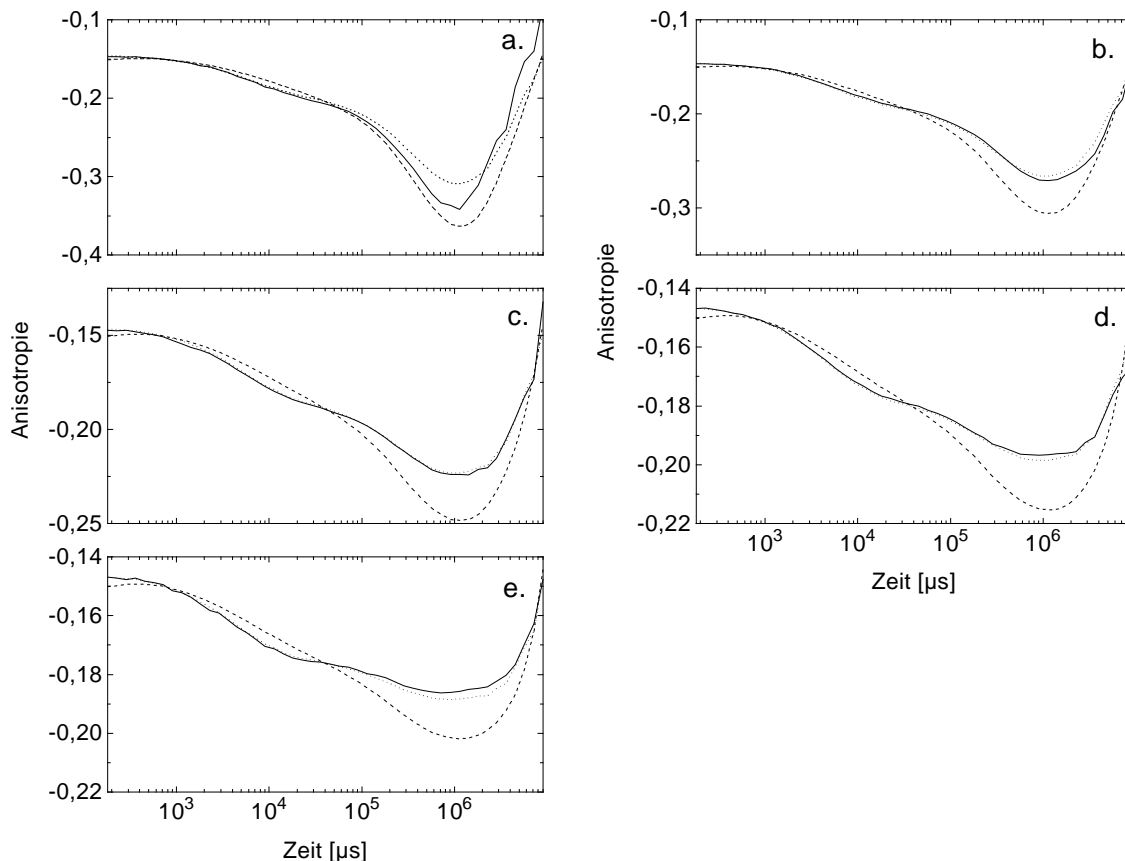


Abbildung 8.7: Vergleich der Anisotropiezeitspuren bei den Wellenlängen $\lambda = 490nm$ (a), $\lambda = 520nm$ (b), $\lambda = 543nm$ (c), $\lambda = 570nm$ (d), $\lambda = 590nm$ (e). — : Meßdaten, - - - : Rekonstruktion unter Berücksichtigung eines N–Zustandes mit Anisotropie $r_N = -0.1238$, ····· : Rekonstruktion unter Berücksichtigung von zwei N–Zuständen mit Anisotropien $r_{N_1} = -0.117$ bzw. $r_{N_2} = -0.130$.

50ms deutlich kleinere Abweichungen zu den Meßdaten zeigt als der Ansatz mit nur einem N-Zustand, ergibt sich für die anderen Wellenlängen (520nm, 543nm, 570nm und 590nm, Abb. 8.7b-e) über den ganzen betrachteten Zeitbereich sehr gute Übereinstimmung. Damit ist ein klarer Beleg für die Notwendigkeit eines zweiten N-Zustandes erbracht.

Die funktionelle Bedeutung eines N_1 - N_2 -Übergangs könnte die Reisoomerisierung des Chromophors sein. Bei neutralem pH-Wert soll dieser Schritt im Übergang vom N-Intermediat zum O-Intermediat ablaufen. Da es unter alkalischen Bedingungen keinen O-Zustand gibt, jedenfalls keinen spektroskopisch nachweisbaren, liegt die Vermutung nahe, daß sich die Reisoomerisierung in einem Zustand vollzieht, bei dem die Gruppe Asp-85 deprotoniert vorliegt. Aus FTIR-Experimenten [Bra96] liegen jedoch Hinweise vor, daß die Gruppe Asp-85 selbst bei einem derart hohen pH-Wert im N-Zustand vollständig protoniert ist und erst im Übergang zum bR-Grundzustand deprotoniert. Die unterschiedlichen Anisotropien in den Zuständen N_1 und N_2 zeigen eine Änderung in der Orientierung des Übergangsdipolmoments an. Da der photoinduzierte Übergang von der all-*trans* Konformation zur 13-*cis*,15-*anti* Konformation mit einer, wenn auch geringen, Orientierungsänderung des Übergangsdipolmoments verbunden war, ist es plausibel, daß dies bei der Reisoomerisierung auch der Fall ist. Ein Beweis für die Reisoomerisierung im N_1 - N_2 -Übergang ist dadurch jedoch nicht erbracht, denn die Isomerisierung ist nicht notwendigerweise an eine Orientierungsänderung des Übergangsdipolmoments gekoppelt, wie das Beispiel der Licht-Dunkel-Adaptation zeigte.

Zur Berechnung der Polarwinkel des Übergangsdipolmoments in den transienten Intermediaten werden die folgenden Anisotropiewerte eingesetzt: $r_M = -0.134 \pm 0.001$, $r_{N_1} = -0.117$, $r_{N_2} = -0.130$ und $r_{bR} = -0.147$. Mit $\theta_{bR} = 70^\circ$ ergibt sich aus Gl.(2.29) $\theta_M = 68.4 \pm 0.2^\circ$, $\theta_{N_1} = 66.3^\circ$ und $\theta_{N_2} = 67.9^\circ$. Aufgrund der Einschränkungen der Anisotropien ist der Wert für N_1 eine Obergrenze, während der Wert für N_2 eine untere Grenze darstellt. Der Winkel für den M-Zustand ist unter alkalischen Bedingungen offenbar um ca. 0.5° kleiner als bei neutralem pH-Wert.

8.2 Experimente im schwach sauren Milieu: Das O-Intermediat

8.2.1 Messungen bei niedriger Temperatur

Obwohl das O-Intermediat spektroskopisch relativ gut von den anderen Intermediaten im all-*trans* Zyklus und vom bR-Grundzustand getrennt ist, sind klare Aussagen über die Anisotropie wegen der schwachen Akkumulation schwer zugänglich. Die Akkumulation des O-Intermediates kann durch eine geeignete Wahl der äußeren Parameter – pH-Wert und Temperatur – erhöht werden. Da der O-Zustand durch die protonierte Form der Akzeptorgruppe Asp-85 charakterisiert ist⁴, korreliert eine Erhöhung der O-Akkumulation mit einer Erniedrigung des pH-Wertes [Sch85]. Bei zu starker pH-Erniedrigung findet jedoch die Protonierung von Asp-85 bereits im Grundzustand statt – die Membranen nehmen eine blaue Färbung an (siehe Kap. 5.4) –, und der eigentliche Photozyklus ist inhibiert. Aus den in der Literatur gezeigten Titrationskurven für den Purpur-Blau-Übergang [Bal96b] bei mittleren Salzkonzentrationen kann entnommen werden, daß bei pH4.7 der Anteil an blauen Membranen noch zu vernachlässigen ist. Eine Erhöhung der O-Akkumulation kann auch durch Temperaturerhöhung erreicht werden [Sch85], was allerdings auch zur Überlagerung

⁴Bei protonierter SB resultiert daraus ein rotverschobenes Absorptionsspektrum.

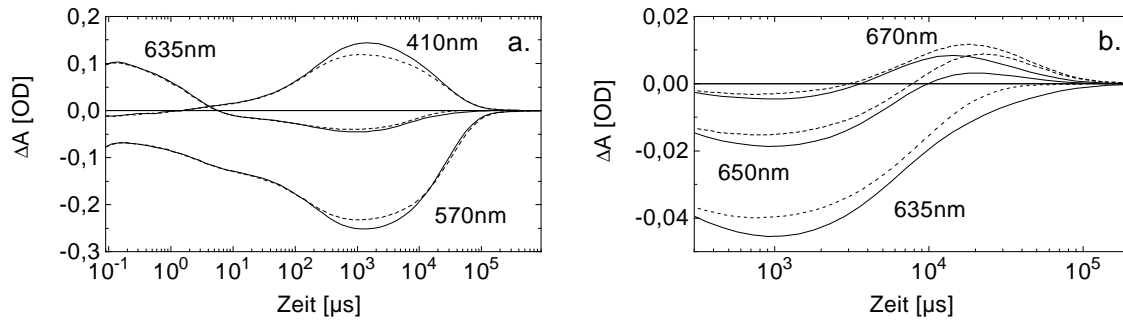


Abbildung 8.8: Isotrope Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ bei pH7 (—) bzw. pH4.7 (- - - -) und $T = 10^\circ\text{C}$ für ausgewählte Wellenlängen. (a) 410nm, 570nm und 635nm im gemessenen Zeitbereich. (b) 635nm, 650nm und 670nm im Zeitbereich $300\mu\text{s} \leq t \leq 200\text{ms}$.

durch den 13-*cis* Zyklus führt (siehe Kap. 6.5.3). Gerade im langwelligen Spektralbereich liefert der 13-*cis* Zyklus aber einen großen Beitrag zur Absorptionsänderung und verfälscht die Information über das O-Intermediat. Aufgrund dieser Einschränkungen wurde zunächst versucht, das Absorptionsspektrum und die Anisotropie des O-Intermediates aus Experimenten bei pH4.7 und niedriger Temperatur ($T = 10^\circ\text{C}$) zu bestimmen.

In Abb. 8.8 ist der Einfluß der pH-Erniedrigung auf die Absorptionsänderung im Photozyklus von nativen PM bei einer Temperatur von 10°C für einige Wellenlängen gezeigt. Die Kurven sind auf die gleiche Anregungseffizienz normiert. Während im vorderen Zeitbereich ($t \leq 100\mu\text{s}$) keine Abhängigkeit vom pH-Wert zu beobachten ist, ergeben sich im *ms*-Zeitbereich beim niedrigen pH-Wert deutlich geringere Absorptionsänderungen, die durch einen höheren L-Anteil bedingt sind. Die Absorptionsänderungen im langwelligen Spektralbereich (Abb. 8.8b) zeigen außerdem für $t \geq 10\text{ms}$, daß bei pH-Erniedrigung ein zusätzlicher positiver Beitrag überlagert ist, der einer Zunahme der O-Akkumulation entspricht. Im Folgenden werden nur noch die Daten behandelt, die bei pH4.7 und $T = 10^\circ\text{C}$ aufgenommen wurden.

Die Anisotropiezeitspuren $R(\lambda, t)$ (Abb. 8.9) für 410nm und 570nm weisen im Zeitbereich von 1ms bis 100ms erwartungsgemäß keine maßgeblichen transienten Änderungen auf. Da die Anisotropie des M-Intermediates vom Betrage kleiner als die Grundzustandsanisotropie ist, verläuft $R(410\text{nm}, t)$ oberhalb von $R(570\text{nm}, t)$. Für den langwelligen Spektralbereich ist nur das Zeitfenster von etwa 20ms bis 80ms interessant. Während die transiente Anisotropie für 635nm noch außerhalb des dargestellten Bereichs liegt und für 650nm oberhalb von $R(410\text{nm}, 1\text{ms})$ verläuft, erreichen die Zeitspuren für 670nm bzw. 690nm einen Wert, der zwischen $R(410\text{nm}, 1\text{ms})$ und $R(570\text{nm}, 1\text{ms})$ liegt. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß die O-Anisotropie zwischen den Anisotropien des M-Intermediates und des bR-Grundzustandes liegt. Durch die spektrale Überlagerung des O-Intermediates mit dem bR-Grundzustand und die, trotz pH-Erniedrigung, relativ schwache O-Akkumulation liefern nur die Anisotropiekurven für 670nm und 690nm klare Anhaltspunkte.

Eine SVD des kombinierten Datenfeldes $(\Delta\mathbf{A}, \Delta\mathbf{AR})^T$, unter Berücksichtigung des gesamten Zeitbereichs ($180\text{ns} \leq t \leq 900\text{ms}$) ergab die Singulärwerte $s = \{ 2.0681, 0.5075, 0.2656, 0.0169, \dots \}$. Obwohl der vierte Singulärwert weniger als 1% des ersten und weniger als 10% des dritten beträgt, deswegen also nicht mehr relevant sein sollte (siehe Abb. 8.10a), läßt die zugehörige Zeitspur vermuten (Abb. 8.10b), daß gerade diese Komponente einen Beitrag zum O-Intermediat liefert. Die globale Anpassung der mit den Singulärwerten gewichteten Basiszeitspuren erfordert zwei Potenzgesetze ($\tau_1 = 2.01\mu\text{s}$, $n_1 = 3.0$ und $\tau_2 = 190\mu\text{s}$, $n_2 = 1.5$)

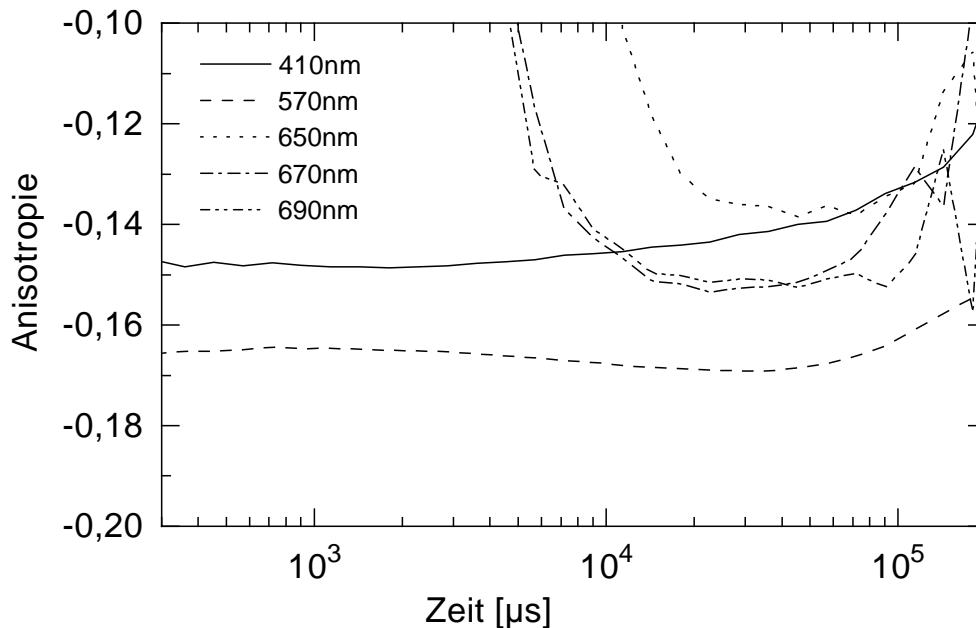


Abbildung 8.9: Transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$ bei pH4.7 und $T = 10^\circ C$ für ausgewählte Wellenlängen im Zeitbereich $300\mu s \leq t \leq 200ms$.

und drei Exponentialfunktionen ($\tau_3 = 740\mu s$, $\tau_4 = 8.9ms$ und $\tau_5 = 34ms$), wobei die erste Exponentialfunktion noch dem M-Aufbau zuzurechnen ist. Da der Beitrag durch den vierten Singulärwert im zeitlichen und spektralen Mittel so klein ausfällt, ist es nicht möglich das in Kap. 4.2.2 beschriebene Auswertungsverfahren um ein weiteres Intermediat zu erweitern. Außerdem liegen die Zeitkonstanten für den Aufbau und den Zerfall des O-Intermediates τ_4 und τ_5 sehr dicht zusammen, so daß die zugehörigen Amplituden entsprechend ungenau sind. Die aus dem Ergebnis der globalen Anpassung bestimmten asymptotischen Differenzspektren für den vorderen Teil des Photozyklus enthalten aber die Information über die Beiträge der frühen Intermediate im Zustandsgemisch, das dem O-Intermediat vorausgeht. Aus dem Vergleich mit den asymptotischen Differenzspektren bei pH7 (siehe Abb. 7.7) ergibt sich, daß die ersten beiden Differenzspektren aufeinander skalierbar sind, d.h.

$$(\tilde{\mathbf{B}}_{pH4.7}^A)_1 = \beta_{11} (\tilde{\mathbf{B}}_{pH7}^A)_1 \quad \text{bzw.} \quad (\tilde{\mathbf{B}}_{pH4.7}^A)_2 = \beta_{22} (\tilde{\mathbf{B}}_{pH7}^A)_2$$

während das dritte Differenzspektrum bei pH4.7 aus dem zweiten und dem dritten Differenzspektrum bei pH7 zu kombinieren ist, also

$$(\tilde{\mathbf{B}}_{pH4.7}^A)_3 = \beta_{23} (\tilde{\mathbf{B}}_{pH7}^A)_2 + \beta_{33} (\tilde{\mathbf{B}}_{pH7}^A)_3$$

Mit dieser Transformation – durch die Koeffizienten β_{ij} wird eine Matrix $\boldsymbol{\beta}$ gebildet – und $\tilde{\mathbf{C}}_{pH7}$ für pH7 läßt sich unmittelbar die Matrix $\tilde{\mathbf{C}}_{pH4.7}$ für pH4.7 generieren:

$$\tilde{\mathbf{C}}_{pH4.7} = \tilde{\mathbf{C}}_{pH7} \boldsymbol{\beta} = \begin{pmatrix} 0.319 & 0.062 & 0.012 \\ 0 & 0.257 & 0.098 \\ 0 & 0.002 & 0.209 \end{pmatrix}$$

Das dritte asymptotische Differenzspektrum enthält also näherungsweise ein Drittel L und zwei Drittel M, der K-Beitrag ist zu vernachlässigen:

$$(\tilde{\mathbf{B}}_{pH4.7}^A)_3 \approx \eta \left(\frac{1}{3}(\vec{A}_L - \vec{A}_{bR}) + \frac{2}{3}(\vec{A}_M - \vec{A}_{bR}) \right)$$

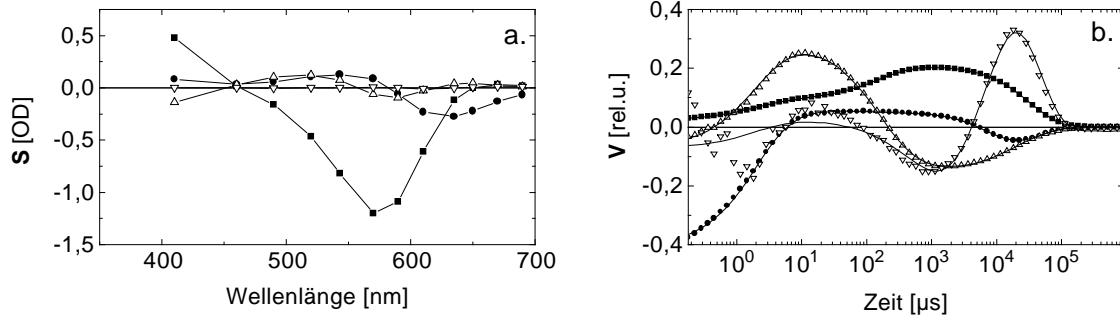


Abbildung 8.10: Ergebnis der SVD des Datenfeldes $(\Delta \mathbf{A}, \Delta \mathbf{AR})^T$ ($180ns \leq t \leq 900ms$). (a) Basisspektren der isotropen Absorptionsänderung: $\mathbf{S} = \mathbf{U}^T \mathbf{D}(s)$, (b) zugehörige Zeitspuren \mathbf{V} , Symbole: Datenpunkte, Linien: Fitkurven. Zuordnung der Komponenten: ■ : $s_1 = 2.0681$, ● : $s_2 = 0.5075$, △ : $s_3 = 0.2656$, ▽ : $s_4 = 0.0169$

Um nun ein weiteres Intermediat miteinzubeziehen, wurde nochmals eine SVD durchgeführt, jedoch wurde der Zeitbereich auf das Intervall $1.8ms \leq t \leq 900ms$ beschränkt. Aus den Singulärwerten $s = \{1.2635, 0.0626, 0.0030, \dots\}$ kann gefolgert werden, daß in diesem Zeitbereich nur noch zwei Komponenten relevant sind. Die Basisspektren (nur \mathbf{S}) und die zugehörigen Zeitspuren sind in Abb. 8.11 dargestellt. Das erste Basisspektrum zeigt nur geringe Abweichungen gegenüber dem skalierten asymptotischen Differenzspektrum, das aus dem vollständigen Datensatz wie oben beschrieben gewonnen wurde und ebenfalls in Abb. 8.11a gezeigt ist. Für den hinteren Teil des Photozyklus läßt sich also ein einfaches Modell ansetzen: Das Gemisch aus L und M zerfällt mit konstantem Konzentrationsverhältnis, während ein zusätzliches Intermediat, das auch ein Zustandsgemisch sein kann und zunächst mit X bezeichnet wird, entsteht und zerfällt. Es ist also eine 2D-Transformationsmatrix \mathbf{X} so zu bestimmen, daß die beiden Gleichungen

$$\left((\vec{A}_{L,M} - \vec{A}_{bR}), (\vec{A}_X - \vec{A}_{bR}) \right) = \mathbf{S} \mathbf{X}^{-1} \quad \text{und} \quad \mathbf{n} = \mathbf{X} \mathbf{V}$$

erfüllt sind. Durch $(\vec{A}_{L,M} - \vec{A}_{bR}) = \frac{1}{\eta} (\vec{B}^A)_3$ ist die erste Spalte von \mathbf{X}^{-1} schon eindeutig bestimmt. Die zweite Spalte von \mathbf{X}^{-1} ergibt sich aus den Nebenbedingungen an die Konzentrationsverläufe und der Forderung, daß das Differenzspektrum $\vec{A}_X - \vec{A}_{bR}$ bei $410nm$ null wird. Es bleibt aber eine Skalierungsunsicherheit für das Differenzspektrum, die nur

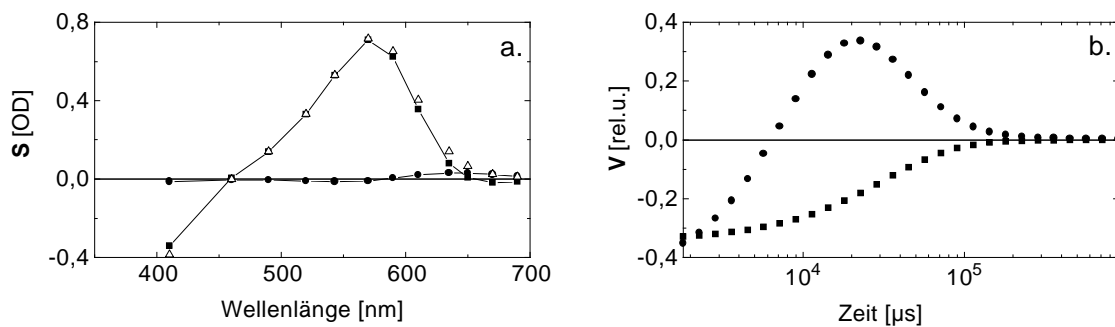


Abbildung 8.11: Ergebnis der SVD des Datenfeldes $(\Delta \mathbf{A}, \Delta \mathbf{AR})^T$ ($1.8ms \leq t \leq 900ms$). (a) Basisspektren der isotropen Absorptionsänderung: $\mathbf{S} = \mathbf{U}^T \mathbf{D}(s)$, (b) zugehörige Zeitspuren \mathbf{V} . Zuordnung der Komponenten: ■ : $s_1 = 1.2635$, ● : $s_2 = 0.0626$, △ : Skaliertes asymptotisches Differenzspektrum vor Relaxation $\tau_4 = 8.9ms$.

empirisch, unter Berücksichtigung der invers skalierenden Konzentration, eingegrenzt werden kann. Aus der zweiten Spalte von \mathbf{X}^{-1} und \mathbf{S}^R ergibt sich auch der Lineardichroismus $r_X \vec{A}_X - r_{bR} \vec{A}_{bR}$, aus dem r_X als wellenlängenabhängige Anisotropie zu erhalten ist. Die Ergebnisse sind für verschiedene Skalierungsfaktoren $f := \alpha \cdot |\vec{A}_X - \vec{A}_{bR}|$ in Abb. 8.12 dargestellt, wobei die Normierung des Differenzspektrums durch einen Faktor α willkürlich festgelegt wurde. Die Untergrenze $f = 0.4$ ist durch die Gesamtkonzentration festgelegt. Ein kleinerer Faktor würde eine für $t \leq 10ms$ ansteigende Gesamtkonzentration zur Folge haben. Die Obergrenze $f = 1.2$ ist dagegen durch das Absorptionsspektrum von X bedingt, denn ein größerer Faktor würde mit negativen Absorptionswerten im Bereich von $500nm$ einhergehen. Das Absorptionsmaximum von \vec{A}_X für $f = 0.4$ liegt zwischen $570nm$ und $590nm$, was durch eine Überlagerung von N und O, mit dominierendem N-Anteil, zu interpretieren wäre. Für $f = 1.2$ liegt das Absorptionsmaximum von \vec{A}_X dagegen bei $635nm$, und die Halbwertsbreite ist vergleichbar mit der des Grundzustandsspektrums. Eine solche spektrale Abhängigkeit entspricht eher einem reinen Chromophorzustand, der das O-Intermediat charakterisiert. Die zugehörigen Anisotropien (Abb. 8.12b) sind allerdings weder mit einem N,O-Gemisch noch mit einem reinen O-Zustand konsistent. Für $f = 0.4$ ergibt sich zwar von $460nm$ bis $610nm$ ein nahezu konstanter Wert (-0.15), der jedoch bezüglich der Grundzustandsanisotropie -0.162 mit der in Kap. 8.1 bestimmten Anisotropie für das N-Intermediat nicht verträglich ist. Da der langwellige Beitrag ($\lambda \geq 635nm$) überwiegend dem O-Intermediat zuzuordnen ist, sollte die Anisotropie über diesen Spektralbereich konstante Werte annehmen. Die Anisotropiewerte bei $635nm$ und $650nm$ liegen aber noch dicht bei den Werten für $\lambda < 635nm$, während die Anisotropiewerte bei $670nm$ und $690nm$ bei -0.16 liegen. Für $f = 1.2$ ist die Anisotropie von X stark wellenlängenabhängig, was gegen einen reinen Chromophorzustand spricht. Dieser Skalierungsfaktor entspricht aber einer extrem geringen Akkumulation, so daß ein minimaler systematischer Fehler vermutlich schon zu

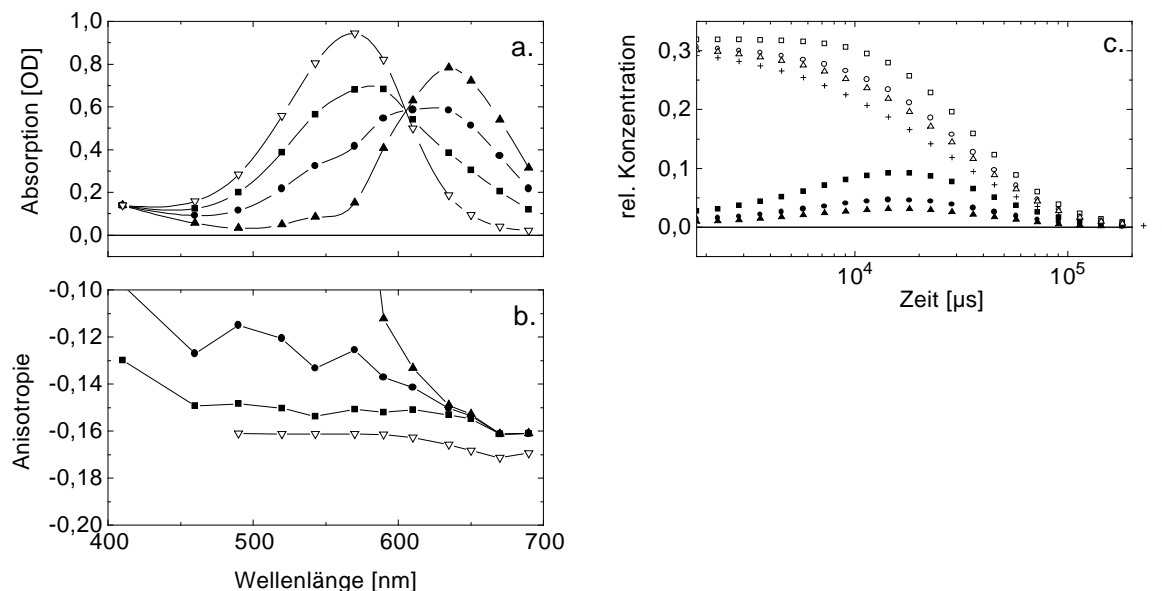


Abbildung 8.12: Ergebnis der Anpassung für verschiedene Skalierungen $f := \alpha \cdot |\vec{A}_X - \vec{A}_{bR}|$. (a) Intermediatsspektren \vec{A}_X , \vec{A}_{bR} , (b) Wellenlängenabhängigkeit der Intermediatsanisotropien, (c) Konzentrationsverläufe. \blacksquare : X für $f = 0.4$, \bullet : X für $f = 0.8$, \blacktriangle : X für $f = 1.2$, ∇ bR. Weitere Symbole in (c): $+$: L,M-Gemisch, \square : Σ für $f = 0.4$, \circ : Σ für $f = 0.8$, \triangle : Σ für $f = 1.2$, wobei $\Sigma := n_{L,M} + n_X$.

großen Abweichungen in der Anisotropie führen kann.

Unter diesen experimentellen Bedingungen – pH4.7 und $T = 10^\circ$ – läßt sich also keine klare Aussage über das Absorptionsspektrum und die Anisotropie des O-Intermediates gewinnen. Die Anisotropiewerte bei 670nm und 690nm deuten darauf hin, daß die O-Anisotropie nur geringfügig von der Grundzustandsanisotropie verschieden ist. Ein wesentlich niedrigerer Wert für die O-Anisotropie, der einer Reorientierung des Übergangsdipolmomentes $\Delta\theta_O$ von etwa $+3^\circ$ im Übergang vom O-Intermediat zum bR-Grundzustand entspräche [Ott95], kann jedoch ausgeschlossen werden. Bei dem von Otto et al. [Ott95] verwendeten Auswertungsverfahren wurde die zeitaufgelösten Lineardichroismusdaten fälschlicherweise auf die Grundzustandsanisotropie bezogen, die durch Gleichlichtmessungen bestimmt worden war, ohne die speziellen Anregungsbedingungen zu berücksichtigen.

8.2.2 Temperaturabhängigkeit im langwelligen Spektralbereich

Da das O-Intermediat bei $T = 10^\circ\text{C}$ wie oben dargestellt nur schwach akkumuliert, wurde, trotz der Artefakte durch die Überlagerung des 13-*cis* Zyklus, auch bei höheren Temperaturen ($T = 20^\circ\text{C}$ und $T = 35^\circ\text{C}$) gemessen. Die Messungen wurden mit den roten Diodenlasern als Meßlichtquelle ($\lambda = 635\text{nm}$ und $\lambda = 670\text{nm}$) durchgeführt, denn Information über das O-Intermediat ist sowieso nur im langwelligen Spektralbereich zu erwarten. Zur Vermeidung von Polarisationsartefakten wurde die Meßlichtintensität bei allen Messungen

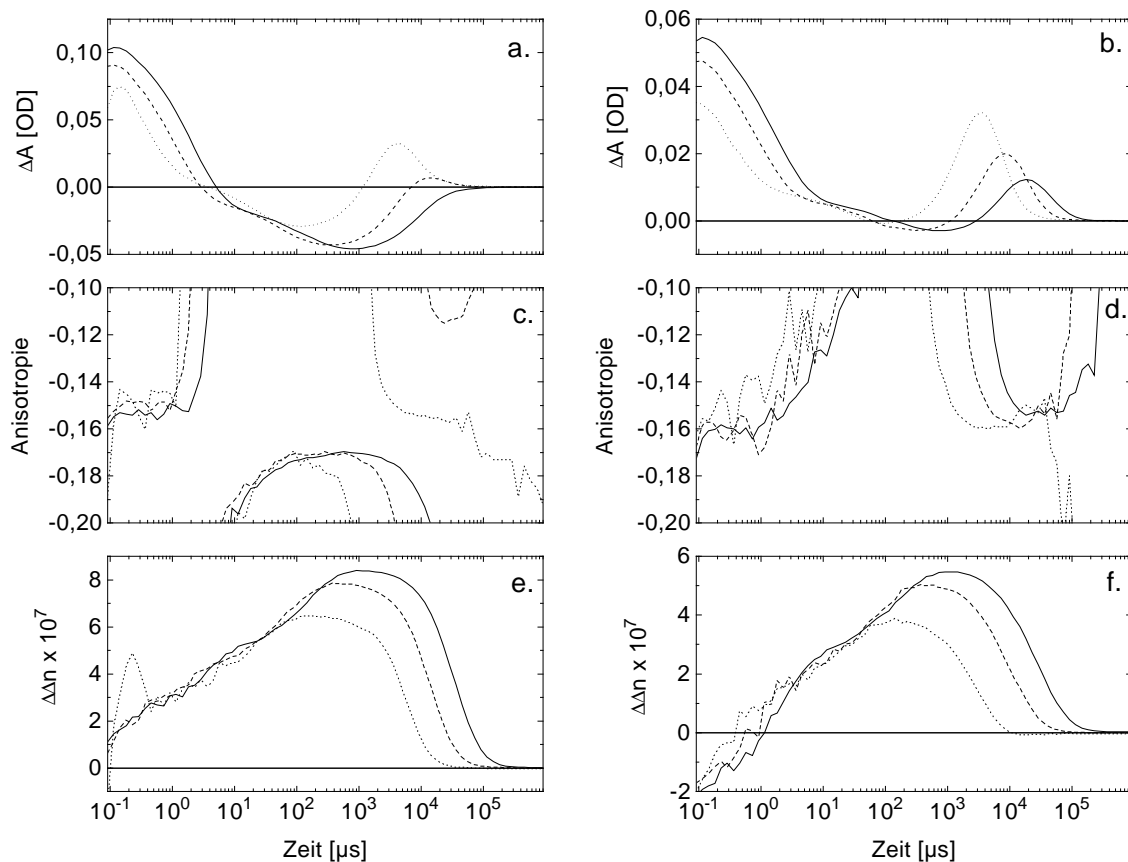


Abbildung 8.13: Temperaturabhängigkeit der isotropen Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ (a,b), der transienten Anisotropie $R(\lambda, t)$ (c,d) und der transienten Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ (e,f) für $\lambda = 635\text{nm}$ (linke Spalte) und für $\lambda = 670\text{nm}$ (rechte Spalte). — : $T = 10^\circ\text{C}$, - - - : $T = 20^\circ\text{C}$ und \cdots : $T = 35^\circ\text{C}$.

auf 5%, bei $\lambda = 635\text{nm}$, $T = 35^\circ\text{C}$ sogar auf 0.8% abgeschwächt. Die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ wurde jeweils bei acht Polarisationswinkeln gemessen, auf 10 Datenpunkte pro logarithmischer Dekade reduziert und mit Gl.(4.10) angepaßt. In Abb. 8.13 ist das Ergebnis der Anpassung, die isotrope Absorptionsänderung, die transiente Anisotropie und die transiente Doppelbrechungsänderung für die beiden Wellenlängen und die drei Temperaturen dargestellt. Die Temperaturabhängigkeit der Absorptionsänderung (Abb. 8.13a,b) läßt erkennen, daß langwellig absorbierende Intermediate mit steigender Temperatur zunehmend akkumuliert werden. Wie in Kap. 6.5.3 gezeigt wurde, trägt neben dem O-Intermediat auch ein Photoprodukt des 13-*cis* Zustandes zu dieser positiven Absorptionsänderung bei. Die transiente Anisotropie (Abb. 8.13c,d) zeigt im μs -Bereich keine systematische Temperaturabhängigkeit. Bei 635nm wird für alle drei Temperaturen im Zeitbereich der maximalen M-Besetzung ein Wert erreicht ($R \approx -0.170$), der nahe an der Grundzustandsanisotropie ($r_{bR} \approx -0.165$) liegt, während die Anisotropie bei 670nm in diesem Zeitbereich keine Information liefert und außerhalb des dargestellten Bereichs liegt. Wegen der Temperaturabhängigkeit der O-Akkumulation erreicht die Anisotropie bei 635nm erst für $T = 35^\circ$ im Zeitfenster der maximalen O-Besetzung einen aussagekräftigen Wert. Dieser Wert stimmt in etwa mit den Anisotropiewerten bei 670nm für alle drei Temperaturen im entsprechenden Zeitbereich überein. Da sich also die Anisotropie bei 670nm mit zunehmender O-Besetzung nur noch minimal ändert, kann gefolgert werden, daß der Beitrag des Grundzustandes vernachlässigbar ist, und der erreichte Anisotropiewert ($R = -0.158 \pm 0.005$) eine gute Abschätzung für das O-Intermediat liefert. Daraus resultiert für den Polarwinkel des Übergangsdipolmoments im O-Zustand ein um höchstens 1.4° kleinerer Wert als für den bR-Grundzustand, also $-1.4^\circ \leq \Delta\theta_O \leq 0^\circ$.

Die Temperaturabhängigkeit der Doppelbrechungsänderung (Abb. 8.13e,f) liefert keine verwertbare Information über das O-Intermediat. Die Abnahme des Maximalwertes mit steigender Temperatur ist vermutlich durch eine Verschiebung der L-M-Gleichwichts bedingt. Der Beitrag des L-Intermediates zur Doppelbrechung ist bei diesen Wellenlängen größer als der Beitrag des M-Intermediates, so daß eine Erhöhung des relativen L-Anteils im L-M-Gleichgewicht die Differenz bezüglich der Doppelbrechung des bR-Grundzustandes reduziert.

8.3 Ergebnisübersicht zu den späten Intermediaten

Um Information über die Nachfolgeintermediate des M-Zustandes N und O zu gewinnen, müssen die Bedingungen so gewählt werden, daß jeweils eines dieser beiden Intermediate transient nicht besetzt wird.

Unter extrem alkalischen Bedingungen (pH10.4) ist das O-Intermediat vollständig unterdrückt, und das N-Intermediat wird bis zu einem relativen Anteil von 65–75% der angeregten Moleküle akkumuliert. Das Spektrum und die mittlere Anisotropie des N-Intermediates konnten dann aus einer Eigenwertgleichung bestimmt werden, wobei die Skalierung des Spektrums nicht eindeutig festgelegt ist. Aus dem zeitlichen Verhalten der mittleren N-Anisotropie konnte geschlossen werden, daß zwei N-Subzustände mit unterschiedlichen Chromophoranisotropien auftreten. Die Orientierung des elektronischen Übergangsdipolmoments in diesen Subzuständen ist durch eine obere bzw. untere Grenze des Polarwinkels eingeschränkt. Die Orientierungsänderung bezüglich des Grundzustandes beträgt für N_1 mindestens $\Delta\theta_{N_1} = -3.7^\circ$ und für N_2 höchstens $\Delta\theta_{N_2} = -2.1^\circ$. Ob mit dem N_1 - N_2 -Übergang auch die Reisoomerisierung des Chromophors von all-*trans* nach 13-*cis* verbunden ist, läßt sich aus der Orientierungsänderung nicht ableiten.

Unter den alkalischen Bedingungen tritt im Zerfall des M-Intermediates ein Beitrag in der transienten Doppelbrechungsänderung auf, der nicht über die Kramers-Kronig-Transformation in Beziehung zum transienten Lineardichroismus steht. Diese Doppelbrechungsänderung tritt im selben Zeitfenster wie das N-Intermediat auf, eine strenge kinetische Kopplung scheint jedoch nicht vorzuliegen. Von der Größenordnung her könnte es sich um einen Pockels-Effekt der Purpurmembran handeln, der außerhalb der Chromophorumgebung wirkt.

Zur Untersuchung des O-Intermediates gibt es keine idealen Bedingungen. Im schwach sauren Milieu (pH4.7) ist zwar das N-Intermediat weitgehend unterdrückt, doch muß der Zerfall eines L,M-Zustandsgemisches berücksichtigt werden. Bei niedriger Temperatur wird das O-Intermediat nur schwach akkumuliert (10–30% der angeregten Moleküle), während bei Temperaturerhöhung die stärkere O-Akkumulation durch ein langwellig absorbierendes Intermediat im 13-*cis* Zyklus überlagert wird. Die Orientierung des Übergangsdipolmoments konnte aus den Anisotropiezeitspuren im langwelligen Spektralbereich ($\lambda \geq 635nm$) abgeschätzt werden und liegt bezüglich des bR-Grundzustandes in einem Bereich $-1.4^\circ \leq \Delta\theta_O \leq 0^\circ$.