

Kapitel 5

Stationäre Chromophorzustände

5.1 Der lichtadaptierte Zustand und chromophorfrem Membranen

5.1.1 Darstellung der Ergebnisse

Die polarisationsabhängige Extinktion $E(\lambda, \theta)$ einer magnetisch orientierten PM-Probe wurde im lichtadaptierten Zustand und nach Ausbleichung mit dem Spektrophotometer gemessen und jeweils über Intervalle von 5nm gemittelt. Eine Höhenliniendarstellung dieser Datenfelder ist in Abb. 5.1a bzw. 5.1c gezeigt. Während die PM-Probe im lichtadaptierten Zustand eine Überlagerung von Lineardichroismus und linearer Doppelbrechung zeigt, überwiegt bei der ausgebleichten Probe die lineare Doppelbrechung. Beide Datenfelder wurden für jede Wellenlänge mit Gl.(4.6) angepaßt, wobei durch einen zusätzlichen Parameter

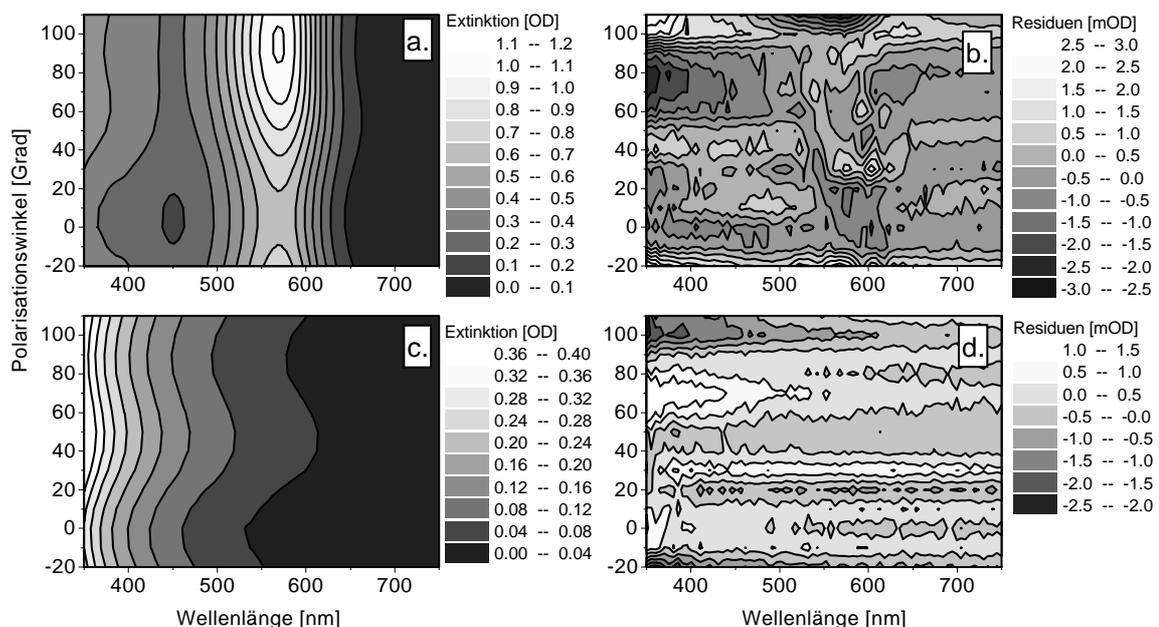


Abbildung 5.1: Höhenliniendarstellung der polarisationsabhängigen Extinktion $E(\lambda, \theta)$ einer magnetisch orientierten Probe, $S_2 \approx 0.47$, pH7.0. (a) PM im lichtadaptierten Zustand. (b) Abweichungen der Daten aus (a) vom Fit mit Gl.(4.6). (c) Chromophorfrem Membranen. (d) Abweichungen der Daten aus (c) vom Fit mit Gl.(4.6).

$\Delta\theta$ die Winkelskala des Polarisators bezüglich der Orientierungsachse der Probe abgeglichen wird. Die Abweichungen der Daten vom Fit, Abb. 5.1b bzw. 5.1d, betragen für die PM nicht mehr als $3mOD$ und für die gebleichten Membranen $2mOD$. Die gute Übereinstimmung von den Meßdaten und der Anpassung läßt darauf schließen, daß die formale Beschreibung des Experimentes durch Beiträge von Lineardichroismus und linearer Doppelbrechung richtig ist. Optische Aktivität, d.h. Zirkulardichroismus und zirkulare Doppelbrechung, kann also bei solchen Experimenten vernachlässigt werden. Zur Verdeutlichung der beteiligten Effekte sind aus beiden Datenfeldern jeweils zwei Wellenlängen, $568nm$ und $633nm$, herausgegriffen und mit der Anpassung durch Gl.(4.6) in Abb. 5.2 gezeigt. Die gestrichelten Linien deuten die fiktive Abhängigkeit der Extinktion vom Polarisationswinkel in Abwesenheit von linearer Doppelbrechung an. Je größer die Absorption, desto geringer ist der relative Beitrag der linearen Doppelbrechung zur Meßgröße $E(\lambda, \theta)$. Doch selbst im Absorptionsmaximum ($\lambda = 568nm$) liefert die Anpassung noch einen recht genauen Wert für die Phasendifferenz ($\Delta\phi_E = 28.8 \pm 0.7^\circ$).

Die Ergebnisse aus der Anpassung der Meßdaten E_0 , S_0 , r_E , r_S , $\Delta n_E = \Delta\phi_E/2\pi \cdot \lambda/d$ und $\Delta n_S = \Delta\phi_S/2\pi \cdot \lambda/d$ sind als Spektren in Abb. 5.3 gezeigt. Aus diesen Parametern erhält man mit Gl.(4.7) die durch den Chromophor bedingten Größen A_0 , r_A and Δn_A , deren spektrale Abhängigkeiten ebenfalls in Abb. 5.3 dargestellt sind. Aus der Absorption $A_0(568nm) = 0.94$ (Abb. 5.3a) läßt sich abschätzen, daß die bR-Konzentration der Probe $C_{w/v} = 0.40mg/ml$ betrug. Die Absorptionsanisotropie r_A (Abb. 5.3b) ist nahezu konstant über der Hauptabsorptionsbande ($500nm < \lambda < 650nm$) und hat dort einen Wert von etwa -0.15 . Auch im Bereich der höheren Absorptionsbanden ($400nm < \lambda < 500nm$) weicht die Absorptionsanisotropie nur wenig von diesem Wert ab. Unter der Annahme, daß der Winkel des Übergangsdipolmomentes im lichtadaptierten bR $\theta_0 = 70^\circ$ ist, folgt aus Gl.(2.28) ein effektiver Ordnungsparameter von $S_2 = 0.47$.

Das Vorzeichen des Chromophorbeitrages zur linearen Doppelbrechung Δn_A (Abb. 5.3d)

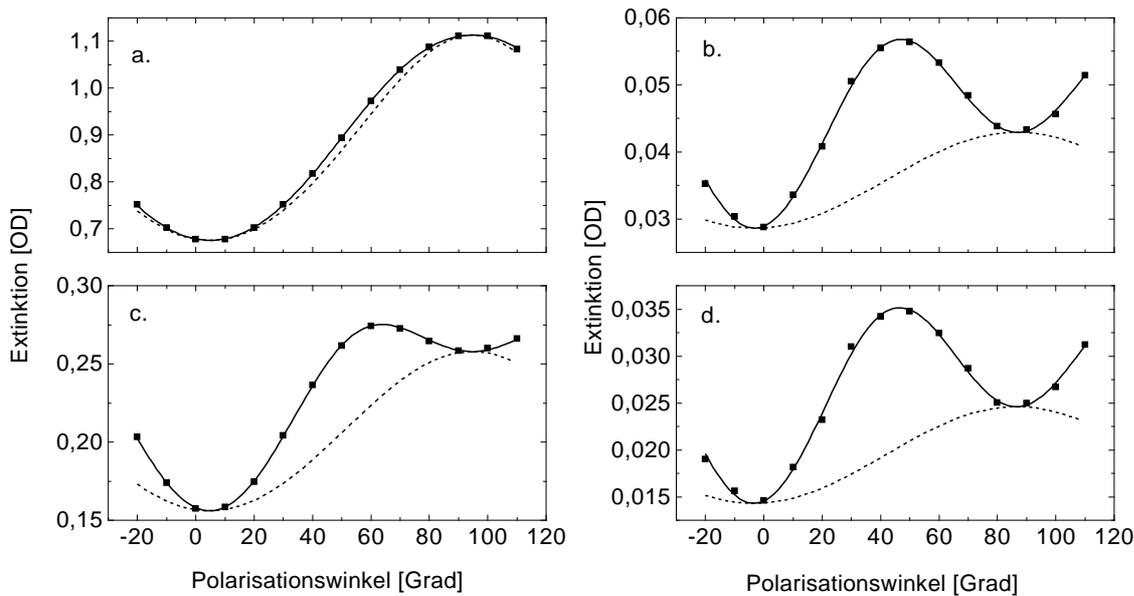


Abbildung 5.2: Wellenlängenausschnitte der Datenfelder aus Abb. 5.1a und 5.1c. (a) PM, $\lambda = 568nm$. (b) Gebleichte Membranen, $\lambda = 568nm$. (c) PM, $\lambda = 633nm$. (d) Gebleichte Membranen, $\lambda = 633nm$. — Fitkurven, - - - - fiktive Abhängigkeit in Abwesenheit von linearer Doppelbrechung.

ergibt sich durch Vergleich mit dem mathematischen Ausdruck (Gl.(2.72)). Da r_A ein negatives Vorzeichen trägt, muß auch Δn_A negativ sein, in einem Wellenlängenbereich, wo $\partial A(\lambda)/\partial \lambda < 0$, d.h. für $\lambda > 570nm$. Aus dem Vorzeichen von Δn_A folgt auch, daß Δn_E und Δn_S negative Vorzeichen haben (Abb. 5.3c), da $|\Delta n_E| > |\Delta n_S|$ für $\lambda > 570nm$. Mit der Kramers–Kronig–Relation Gl.(2.72) wurde auch eine numerische Berechnung von Δn_A aus A_0 und r_A durchgeführt. Damit im Integranden keine echte Singularität auftritt, wird λ stets so gewählt, daß es in der Mitte zwischen den Stützstellen λ' liegt. Die Hauptwert des Integrals läßt sich so durch numerische Integration nach der Trapezregel ausreichend genau approximieren. Der Vergleich mit dem experimentell bestimmten Spektrum von Δn_A zeigt sehr gute Übereinstimmung (Abb. 5.3d), abgesehen von den Abweichungen außerhalb der Hauptabsorptionsbande.

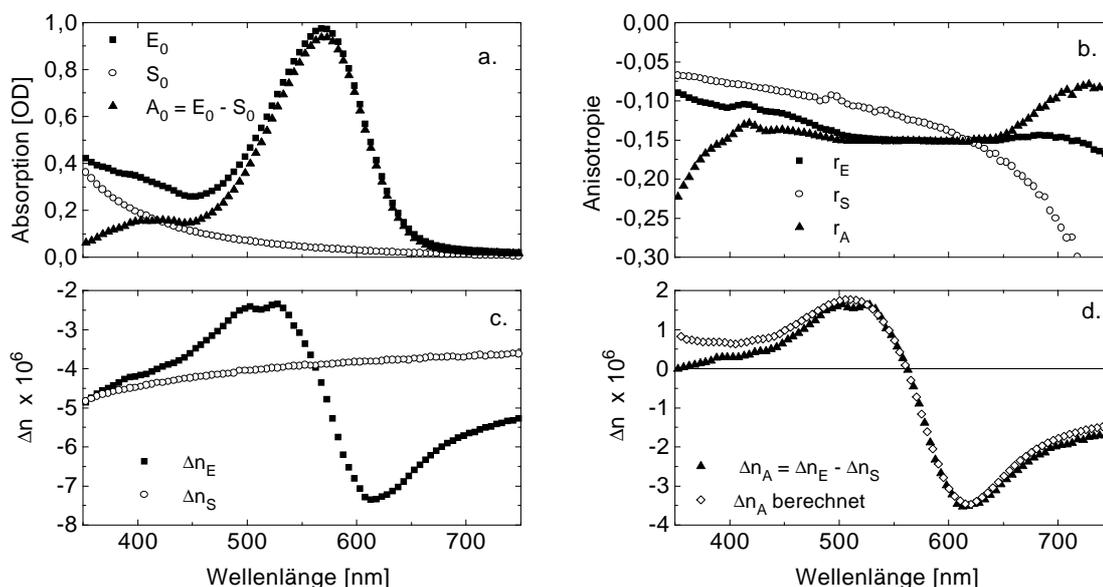


Abbildung 5.3: Ergebnisse aus der Anpassung der Meßdaten für PM im lichtadaptierten Zustand und chromophorfremembranen. (a) Extinktion. (b) Anisotropie. (c) Lineare Doppelbrechung. (d) Chromophoranteil der linearen Doppelbrechung und Berechnung nach Gl.(2.72).

5.1.2 Die Beiträge zum Brechungsindex von Purpurmembranen

Um die Ergebnisse mit den Messungen anderer Gruppen zu vergleichen, sei zunächst eine bestimmte Wellenlänge, nämlich $\lambda = 633nm$, herausgegriffen. Die Auswertung liefert für die untersuchte Probe ($S_2 = 0.47$, $C_{w/v} = 0.40mg/ml$) bei dieser Wellenlänge $\Delta n_E = -7.1 \cdot 10^{-6}$, $\Delta n_S = -3.8 \cdot 10^{-6}$ und $\Delta n_A = -3.3 \cdot 10^{-6}$. Da die Doppelbrechung Δn nach Gl.(2.69) und Gl.(2.64) proportional zur Konzentration $C_{w/v}$ und zum Ordnungsparameter S_2 ist, lassen sich diese Werte auf eine Proteinkonzentration von $C_{w/v} = 1mg/ml$ und einen Ordnungsparameter von $S_2 = 1$, also perfekte Orientierung, normieren: $\Delta n_E = -3.8 \cdot 10^{-5}$, $\Delta n_S = -2.0 \cdot 10^{-5}$ und $\Delta n_A = -1.8 \cdot 10^{-5}$. Normiert auf dieselbe Proteinkonzentration und nach unendlicher Magnetfeldstärke extrapoliert hatten die Messungen von Lewis et al. [Lew85] einen Wert von $|\Delta n| = 3.2 \cdot 10^{-5}$ ergeben, der sowohl Form- als auch intrinsische Doppelbrechung enthält. Unter Berücksichtigung diverser möglicher Fehlerquellen, die aus unterschiedlichen Meßmethoden und der Normierung resultieren, ist die Übereinstimmung (nur 10% Abweichung) recht gut. Daß das Experiment von Lewis et al. einen etwas kleine-

ren Wert als $|\Delta n_E|$ liefert, könnte durch eine Krümmung der Membranen hervorgerufen sein [Cz90], die den effektiven Ordnungsparameter S_2 reduziert. Nimmt man nämlich eine sphärische Krümmung mit einheitlichem Krümmungswinkel 2ψ an, dann wird der effektive Ordnungsparameter um einen Faktor $S_{curv} = \frac{1}{2}(\cos^2\psi + \cos\psi)$ reduziert. Während bei Lewis et al. [Lew85] die Formdoppelbrechung als der dominante Beitrag betrachtet worden war, kann aus den Werten für Δn_S und Δn_A geschlossen werden, daß Form- und intrinsische Doppelbrechung in etwa in der selben Größenordnung liegen. Mit Hilfe von Gl.(2.68) kann der Beitrag der Formdoppelbrechung zu Δn_S abgeschätzt werden. Dazu ist zunächst der relative Volumenanteil der Membranen C_V mit Gl.(2.69) zu berechnen. Aus der Dicke der Membranen $t = 50\text{Å}$, der Gitterkonstanten $a = 63\text{Å}$, dem Molekulargewicht $M = 26800\text{g/mol}$ und der Proteinkonzentration $C_{w/v} = 1\text{mg/ml}$ ergibt sich $C_V = 1.28 \cdot 10^{-3}$. Mit diesem Wert, sowie dem Brechungsindex der Lösung $n_l = 1.33$ und dem mittleren Brechungsindex der Membranen $\bar{n} = 1.50$ folgt aus Gl.(2.68) die Formdoppelbrechung $\Delta n_{form} = -5.0 \cdot 10^{-5}$. Dieser Wert ist zwar in der richtigen Größenordnung, aber trotzdem im Betrag noch deutlich größer als Δn_S . Die naheliegendste Erklärung ist, daß bei den gebleichten Membranen auch die intrinsische Doppelbrechung zu Δn_S beiträgt ($\Delta n_S = \Delta n_{Form} + \Delta n_{intr}$). Demnach wäre die intrinsische Doppelbrechung $\Delta n_{intr} = +3.0 \cdot 10^{-5}$.

Aus dem Chromophorbeitrag zur intrinsischen Doppelbrechung Δn_A , dem Volumenanteil der Membranen C_V , und unter der Annahme von $n_l/\bar{n} = 0.88$, folgt nach Gl.(2.67) $n_1 - n_2 = -0.016$, die Differenz der Brechungsindizes bezüglich der Hauptachsen in PM. Dieser Wert läßt sich auch als Differenz der Chromophorbeiträge $\delta n_1 - \delta n_2$ verstehen. Betrachtet man Gl.(2.70) und Gl.(2.71) für perfekte Ordnung – für $S_2 \equiv 1$ ist $r_A = P_2(\cos\theta_0)$ – und $C_V = 1.0$, so folgt daraus $\delta n_{||} = \delta n_1$ und $\delta n_{\perp} = \delta n_2$. Damit vereinfacht sich die Abhängigkeit vom Chromophorwinkel θ_0 :

$$\delta n_1 - \delta n_2 \sim 3P_2(\cos\theta_0) \quad , \quad \delta n_1 \sim 1 + 2P_2(\cos\theta_0) \quad \text{und} \quad \delta n_2 \sim 1 - P_2(\cos\theta_0) \quad (5.1)$$

Aus diesen Beziehungen wiederum folgt:

$$\delta n_1 = \frac{1 + 2P_2(\cos\theta_0)}{3P_2(\cos\theta_0)}(\delta n_1 - \delta n_2) \quad \text{und} \quad \delta n_2 = \frac{1 - P_2(\cos\theta_0)}{3P_2(\cos\theta_0)}(\delta n_1 - \delta n_2) \quad (5.2)$$

Für $\theta_0 = 70^\circ$ ($P_2(\cos(70^\circ)) = -0.325$) erhält man $\delta n_1 = +0.006$ und $\delta n_2 = +0.022$. Die Größe δn_2 kann als Beitrag des Chromophors zum Brechungsindex von PM für senkrechten Lichteinfall, d.h. der einfallende Lichtstrahl ist senkrecht zur Membranebene, betrachtet werden. In diesem Sinne liefert das Experiment von Zeisel und Hampp [Zei92] vergleichbare Information. Dort wurden lichtinduzierte Brechungsindex- und Absorptionsänderungen in bR-Filmen mit einem modifizierten Michelson-Interferometer gemessen. Durch kontinuierliche Beleuchtung der Filme wurde ein photostationäres Gleichgewicht zwischen dem bR-Grundzustand und hauptsächlich dem M-Intermediat erzeugt. Die Absorptionsänderung und deshalb auch die Brechungsindexänderung ist proportional zum Anteil der Moleküle η , die im statistischen Mittel im M-Zustand sind. Die Berechnung der Brechungsindexänderung aus der gemessenen Verzögerung hängt außerdem auch vom relativen Volumenanteil der PM in den Filmen ab. Der Zusammenhang zwischen δn_2 und der von Zeisel und Hampp betrachteten Größe Δn ist somit:

$$\Delta n = C_V \eta (\delta n_2 - \delta n_2^M) \quad (5.3)$$

Eine numerische Abschätzung ergibt, daß der Beitrag von M zum Brechungsindex δn_2^M , bei $\lambda = 633\text{nm}$ ungefähr einen Faktor 0.25 bezüglich des Beitrags vom bR-Grundzustand δn_2

beträgt. Ferner läßt sich für Filme von $25\mu\text{m}$ Dicke und einer Absorption von 5 OD bei $\lambda = 570\text{nm}$ der Volumenanteil der Membranen mit $C_V = 0.8$ abschätzen. Eine Modulation der Absorption von $\Delta A = 0.55\text{OD}$ bei $\lambda = 633\text{nm}$ bedeutet, daß der Anteil der angeregten Moleküle η etwa 0.5 ist. Unter diesen Annahmen und $\delta n_2 = +0.022$ liefert Gl.(5.3) $\Delta n = 0.0066$, was etwas kleiner ist als der von von Zeisel und Hampp ermittelte Wert ($\Delta n = 0.008$), aber immerhin in der gleichen Größenordnung. Es sei jedoch erwähnt, daß die Skalierung von deren Daten mit einer nicht näher spezifizierten Unsicherheit behaftet war. Würde man einen größeren Volumenanteil der PM in den Filmen annehmen, oder einen höheren Anteil an angeregten Molekülen, oder gar beides, wäre die Übereinstimmung besser. Zur Bestimmung des Brechungsindex von PM in Filmen wurde auch ein Experiment von Zhang et al. [Zha94] durchgeführt, bei dem der kritische Winkel für einige Wellenlängen ermittelt wurde. Dieses Experiment sollte auch den Beitrag des Chromophors zum Brechungsindex zeigen. Da der Meßstrahl in der Einfallsebene polarisiert war, würde man annehmen, daß der gemessene δn -Beitrag kleiner als δn_2 aber größer als δn_1 wäre. Überraschenderweise war das dispersive Verhalten glasähnlich und zeigte keine anomalen Effekte auf Grund des Chromophors in einem Wellenlängenbereich von 410nm bis 675nm . Die Meßgenauigkeit wurde mit ± 0.002 angegeben.

5.2 Die Licht–Dunkel–Adaptation

Zur Untersuchung von Änderungen der Chromophorkonformation wurde die polarisationsabhängige Extinktion $E(\lambda, \theta)$ einer magnetisch orientierten PM–Probe im dunkeladaptierten und lichtadaptierten Zustand mit dem Spektrophotometer gemessen. Eine Mittelung erfolgte wieder über Wellenlängenintervalle von 5nm . Die gemittelten Datenfelder wurden für jede Wellenlänge mit Gl.(4.6) angepaßt. Wie in Kap. 5.1 wurde mit den Daten einer gebleichten Probe (S_0, r_S und Δn_S) eine entsprechende Streukorrektur gemäß Gl.(4.7) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.4 dargestellt. In den Absorptionsspektren A_0^{LA} und A_0^{DA} (Abb. 5.4a) zeigt sich nur eine geringe Verschiebung. Das Differenzspektrum $\Delta A(\lambda) = A_0^{LA} - A_0^{DA}$ (Abb. 5.4b) weist eine typische Charakteristik auf, die auch von anderen Gruppen [Bal96a, Kou85] gefunden wurde. Die schmalen Banden bei 400nm und 430nm , die sogenannten β -Banden, sind der all-*trans*-Konformation zuzuordnen und verschwinden beim Übergang zur 13-*cis*-Konformation [Bal96b]. Die Absorptionsanisotropien r_A^{LA} und r_A^{DA} (Abb. 5.4c) sind nahezu identisch. Die Anisotropie des Differenzspektrums $R := (A_0^{LA} r_A^{LA} - A_0^{DA} r_A^{DA}) / \Delta A$ stimmt im Wellenlängenbereich von 560nm und 640nm ebenfalls gut mit r_A^{LA} und r_A^{DA} überein (Abb. 5.4c). An den Nullstellen von ΔA wird R singulär. Unterhalb von 500nm hat R wenig Aussagekraft, da höhere Absorptionsbanden überlagert sind. Die Übereinstimmung der Anisotropien (im Rahmen der Meßgenauigkeit $\Delta r = \pm 0.002$) in dem relevanten Wellenlängenbereich läßt darauf schließen, daß sich die Richtung des Übergangsdipolmomentes im Übergang von der all-*trans*-Konformation zur 13-*cis*-Konformation nicht ändert. Dieses Ergebnis wird auch durch die gemessene Differenz in der linearen Doppelbrechung $\Delta \Delta n := \Delta n_A^{LA} - \Delta n_A^{DA}$ bestätigt, indem zum Vergleich die Berechnung über die Kramers–Kronig–Relation hinzugezogen wird (Abb. 5.4d). Wegen der Linearität des Integrals kann die Berechnung einerseits mit $(A_0^{LA}(\lambda) r_A^{LA} - A_0^{DA}(\lambda) r_A^{DA})$ im Zähler des Integranden durchgeführt werden und andererseits mit $\Delta A(\lambda)$ und einem konstanten Anisotropiewert¹ von -0.152 . Beide Berechnungen führen zu einer sehr guten Übereinstimmung mit der gemessenen Differenz der linearen Doppelbrechung. Die Messun-

¹Der konstante Anisotropiewert impliziert $r_A^{LA} \equiv r_A^{DA}$

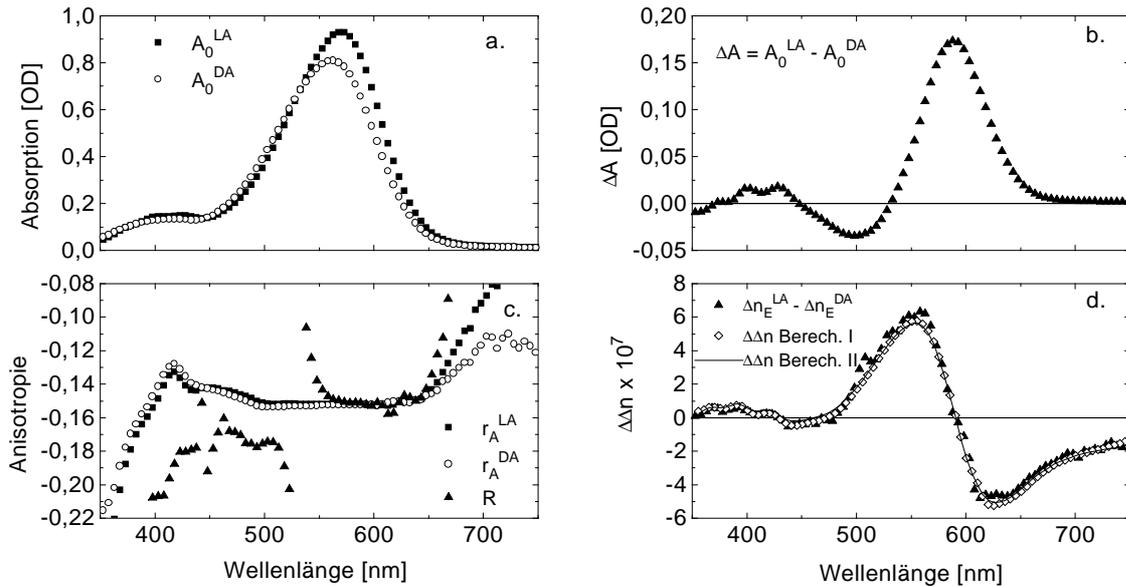


Abbildung 5.4: Ergebnisse aus der Anpassung der Meßdaten für PM im lichtadaptierten und dunkeladaptierten Zustand. (a) Absorption. (b) Absorptionsdifferenz. (c) Anisotropie. (d) Chromophoranteil der linearen Doppelbrechung und Berechnung nach Gl.(2.72), I: mit $(A_0^{LA}(\lambda)r_A^{LA} - A_0^{DA}(\lambda)r_A^{DA})$. II: mit $\Delta A(\lambda) \cdot (-0.152)$

gen von Schertler et al. [Sch91] an bR-Mikrokristallen hatten ebenfalls keine signifikanten Orientierungsänderungen ergeben. Bei diesen Experimenten ist jedoch zu berücksichtigen, daß sich die bR-Moleküle in den Kristallen nicht in nativer Umgebung befinden, und daher spektrale und funktionelle Unterschiede gegenüber bR in der Purpurmembran auftreten. Außerdem konnte die Orientierung der Monomere bezüglich der Kristallachsen nicht exakt bestimmt werden.

Daß die Isomerisierung um die 13–14 Doppelbindung des Retinals nicht zu einer Reorientierung des Übergangsdipolmomentes führt, erscheint überraschend. Unter der Annahme, daß die Richtung des Übergangsdipolmomentes mit dem C_5 -N-Verbindungsvektor zusammenfällt [Dri84], unabhängig von der Retinalkonformation, würde man eher eine Zunahme des Winkels zwischen Übergangsdipolmoment und Membrannormale, und zwar um etwa 10° , erwarten. Die Retinalkette würde dann vom β -Iononring bis zum C_{13} -Atom in unveränderter Position bleiben, während die Schiffsche Base eine Auslenkung erfahren würde. Da die experimentellen Ergebnisse aber keine Änderung im Übergangsdipolmoment zeigen, ist diese Modellvorstellung offenbar falsch. Stattdessen ist anzunehmen, daß die Lage des C_5 - und des N-Atoms durch die Isomerisierung nicht geändert wird. Die 13-*cis*-Konformation wäre dann nur dadurch zu realisieren, daß der C_5 - C_{13} -Verbindungsvektor einen kleineren Winkel zur Membrannormalen einnimmt.

5.3 Purpurmembranen in anisotrop gequollenen Gelen

Zur Charakterisierung von PM-Proben, die durch Trocknen und anisotropes Quellen orientiert wurden, erfolgten die Messungen der polarisationsabhängige Extinktion $E(\lambda, \theta)$ nach dem selben Prinzip wie bei den magnetisch orientierten Proben. Ebenso wurden die Daten durch Mittelung über Wellenlängenintervalle von 5nm geglättet und anschließend für jede Wellenlänge mit Gl.(4.6) angepaßt. Für die hier vorgestellten Messungen wurden PM der

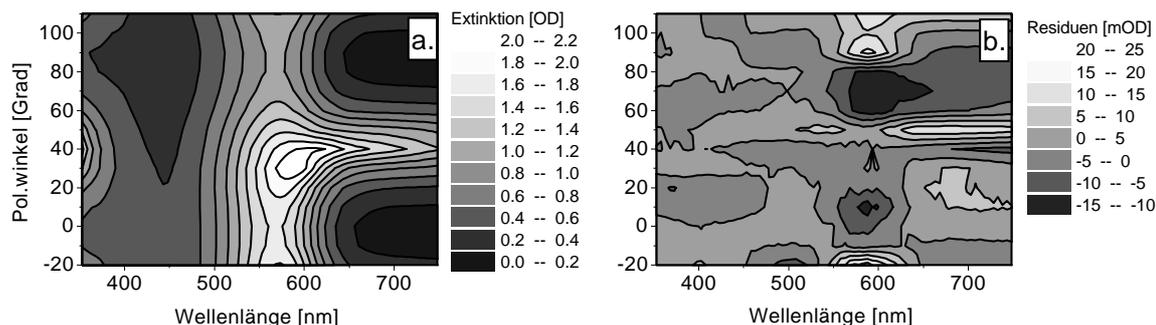


Abbildung 5.5: Höhenliniendarstellung der polarisationsabhängigen Extinktion $E(\lambda, \theta)$ einer durch anisotropes Quellen orientierten Probe, D96A, pH8.0 (a) PM im lichtadaptierten Zustand. (b) Abweichungen der Daten aus (a) vom Fit mit Gl.(4.6).

Mutante D96A bei einem pH-Wert von 8.0 verwendet, was aber unerheblich für die Aussage der Ergebnisse ist. Da für den Quellvorgang eine Küvette mit quadratischem Querschnitt ($5\text{mm} \times 5\text{mm}$) verwendet wurde, konnte durch zwei äquivalente Seiten gemessen werden. Das gemittelte Datenfeld sowie die Abweichungen der Anpassung (für eine der beiden äquivalenten Richtungen) sind in einer Höhenliniendarstellung in Abb. 5.5 gezeigt. Im Vergleich mit Abb. 5.1 fällt sofort auf, daß die Doppelbrechungseffekte bei den anisotrop gequollenen Gelen wesentlich stärker sind als bei den magnetisch orientierten Proben. Die Abweichungen der Anpassung (Abb. 5.5a) sind mit -15mOD bis $+25\text{mOD}$ auch deutlich größer, was vermutlich durch leichte Inhomogenitäten der Probe bedingt ist. Zur Verdeutlichung der enorm starken Doppelbrechung sind aus dem Datenfeld von Abb. 5.5a die beiden Wellenlängen $\lambda = 568\text{nm}$ und $\lambda = 633\text{nm}$ herausgegriffen und in Abb. 5.6b dargestellt. Selbst im Absorptionsmaximum ist der relative Beitrag der Doppelbrechung ganz erheblich und nicht durch intrinsische und Formdoppelbrechung der PM zu erklären. Bei den anisotrop gequollenen Gelen ist es jedoch nicht überraschend, daß Spannungsdoppelbrechung solch einen großen Beitrag liefern kann.

Die Ergebnisse der Anpassung für die beiden äquivalenten Richtungen der Küvette sind in Abb. 5.7 gezeigt. Da auf ein Ausbleichen der Probe verzichtet wurde, konnten die Chromophorbeiträge $A_0(\lambda)$, $r_A(\lambda)$ und $\Delta n_A(\lambda)$ nicht unmittelbar bestimmt werden. Obwohl die Messungen für beide Richtungen äquivalent sein sollten, zeigt sich in der Anisotropie (Abb. 5.7b) ein deutlicher Unterschied. Entweder sind auch hierfür Inhomogenitäten verantwortlich, oder aber die Probe hat durch das Quellen keine exakte uniaxiale Symmetrie erhalten. Die Abweichungen stellen jedoch kein gravierendes Problem dar. Das Vorzeichen

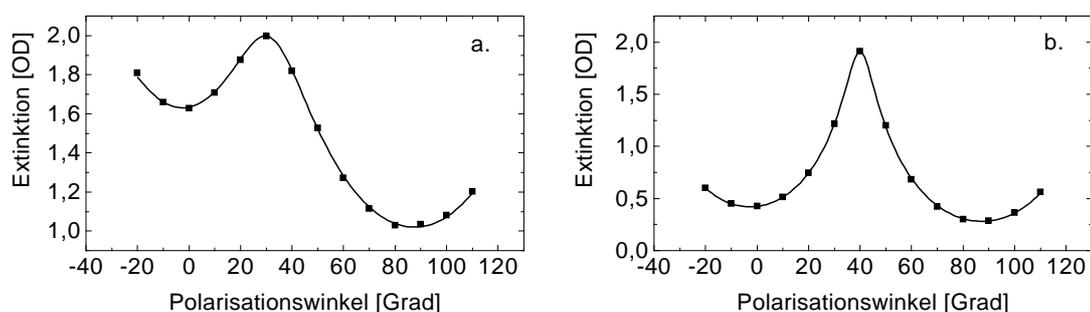


Abbildung 5.6: Wellenlängenausschnitte des Datenfeldes aus Abb. 5.5a. (a) $\lambda = 568\text{nm}$. (b) $\lambda = 633\text{nm}$.

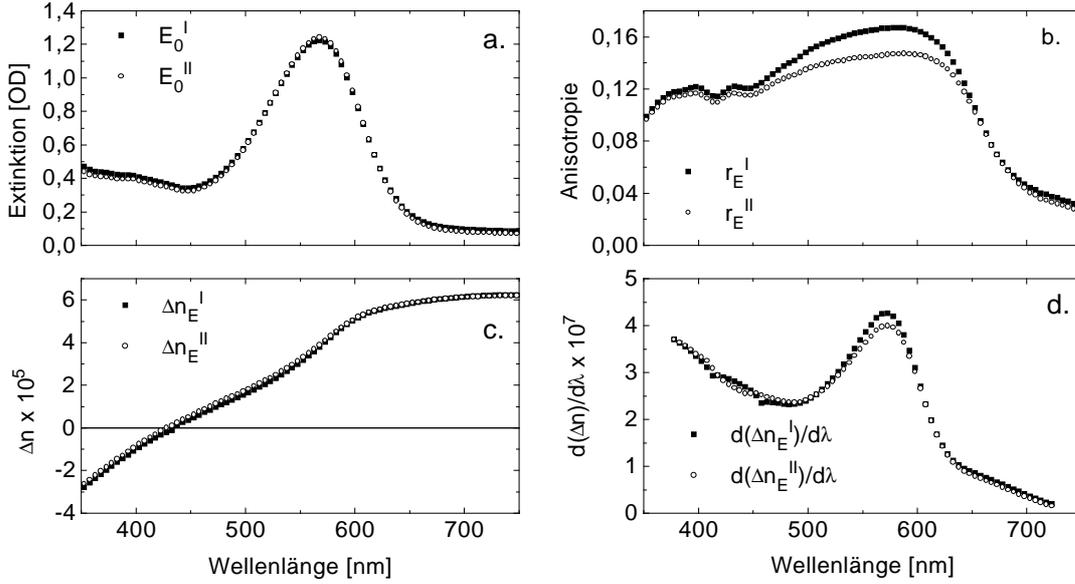


Abbildung 5.7: Ergebnisse aus der Anpassung der Meßdaten eines durch anisotropes Quellen orientierten Gels (D96A, pH8.0), für die beiden äquivalenten Richtungen (I und II). (a) Extinktion. (b) Anisotropie. (c) Lineare Doppelbrechung. (d) Ableitung der Daten von (c) nach der Wellenlänge.

der linearen Doppelbrechung $n_E(\lambda)$ (Abb. 5.7c) wurde willkürlich gewählt, der Vorzeichenwechsel bei $\lambda = 430\text{nm}$ erscheint wegen der Stetigkeit der Ableitung plausibler. Wegen der starken überlagerten Spannungsdoppelbrechung ist der anomal dispersive Teil, d.h. der Chromophorbeitrag zur Doppelbrechung $n_A(\lambda)$, in Abb. 5.7c kaum zu erahnen. Auch die (inverse) Kramers–Kronig–Transformation (siehe Gl.(2.61)) liefert kein vernünftiges Ergebnis. Man kann sich aber behelfen, indem man die Ableitung von Δn_E betrachtet, die in Abb. 5.7d dargestellt ist. Es ergibt sich eine Kurve, die dem Absorptionsspektrum ähnlich ist. Dieser Zusammenhang erklärt sich durch Bildung der formalen Ableitung nach der Wellenlänge von Gl.(2.72):

$$\frac{\partial}{\partial \lambda} \Delta n_A(\lambda) = \frac{3 \ln 10}{\pi^2 d \lambda} P \int_0^\infty d\lambda' \frac{A(\lambda') r_A(\lambda')}{\left(\frac{\lambda}{\lambda'} - \frac{\lambda'}{\lambda}\right)^2} \quad (5.4)$$

Der Ausdruck $\left(\frac{\lambda}{\lambda'} - \frac{\lambda'}{\lambda}\right)^{-2}$ kann als Approximation für die Distribution $\delta(\lambda - \lambda')$ betrachtet werden, und es folgt daraus $\frac{\partial}{\partial \lambda} \Delta n_A(\lambda) \sim \frac{1}{\lambda} A(\lambda) r_A(\lambda)$. Diese Beziehung liefert zwar keine Aussage über den Absolutwert von $A_0(\lambda) r_A(\lambda)$, da die Normierung der approximierten Distribution nicht so ohne weiteres klar ist und $\Delta n_E(\lambda)$ nicht nur $\Delta n_A(\lambda)$ enthält, doch lassen sich wenigstens die Messungen für die beiden Richtungen (I und II) damit vergleichen. Die Ableitung von Δn_E^I hat im Maximum der Absorptionsbande einen größeren Wert als die Ableitung von Δn_E^{II} (Abb. 5.7d), was auch mit den zugehörigen Anisotropien ($r_E^I > r_E^{II}$) konsistent ist.

Für die Bestimmung der Chromophoranisotropie r_A sind die Kramers–Kronig–Relationen ein nützliches Instrument, ohne daß der Chromophorbeitrag zur Doppelbrechung n_A benötigt wird. Dazu wird zunächst das Spektrum $E_0(\lambda) r_E(\lambda)$ der zu untersuchenden Probe Kramers–Kronig–transformiert (Abb. 5.8). Um festzustellen, welchen Anteil der Streuuntergrund in der erhaltenen Transformationskurve hat, wird das Spektrum einer gebleichten Probe (nur S_0 , siehe Kap. 5.1.1) ebenfalls Kramers–Kronig–transformiert. Man stellt fest,

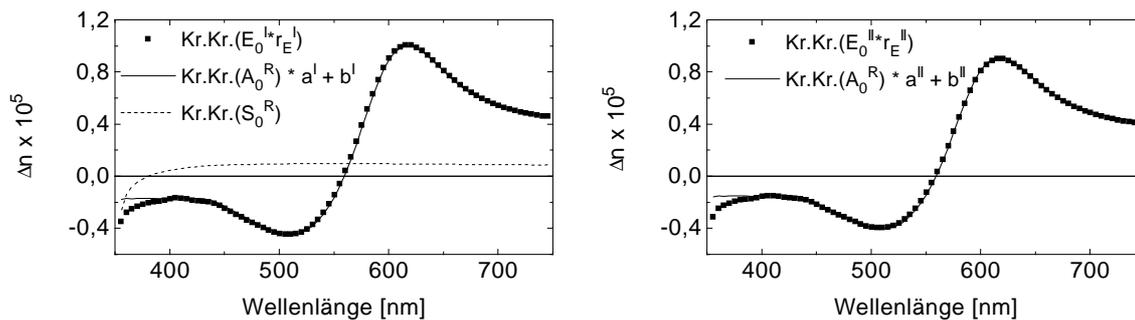


Abbildung 5.8: Kramers-Kronig-Transformation von $E_0(\lambda)r_E(\lambda)$ (■), A_0^R , skaliert (—), S_0^R (- - -). (a) Richtung I, (b) Richtung II.

daß sich für $\lambda > 450\text{nm}$ in guter Näherung ein konstanter Untergrund ergibt (Abb. 5.8). Daraus folgt wiederum, daß der Streuuntergrund des Spektrums $E_0(\lambda)r_E(\lambda)$ in der Kramers-Kronig-Transformation ebenfalls nur einen konstanten Untergrund liefert. Als Referenz wird nun die Transformation des, aus den anderen Experimenten bestimmten, Absorptionsspektrums $A_0 =: A_0^R$ (Referenzspektrum) verwendet. Diese Transformationskurve läßt sich nun lediglich durch einen Skalierungsfaktor a und einen konstanten Parameter b an die Transformationskurve von $E_0(\lambda)r_E(\lambda)$ anpassen (Abb. 5.8). Der Skalierungsfaktor setzt sich zusammen aus dem Konzentrationsverhältnis ($C_M/C_M^R = \frac{A_0}{d}/\frac{A_0^R}{d^R}$) und der zu bestimmenden Chromophoranisotropie r_A . Zur Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses muß nur die Absorption A_0 für eine bestimmte Wellenlänge, z.B. $\lambda = 568\text{nm}$ abgeschätzt werden. Für die beiden Richtungen ergeben sich aus einer Anpassung (per Augenmaß) $r_A^I = 0.175$ und $r_A^{II} = 0.155$. Diese empirisch ermittelten Werte sind als Mittelwert über die Hauptabsorptionsbande zu verstehen. Der Vorteil dieser Abschätzung liegt darin, daß der Streuuntergrund nicht für jede neue Probe experimentell durch Messung nach Ausbleichung ermittelt werden muß.

Die Werte von r_A^I und r_A^{II} deuten auf einen sehr hohen Ordnungsgrad hin, denn in dieser Symmetrie kann der Ordnungsparameter S_2 bestenfalls einen Wert von -0.5 erreichen. Aus r_A ist daher ein minimaler Chromophorwinkel θ_0 zu berechnen. Da r_A^I und r_A^{II} bei dieser Probe nicht identisch sind, sei der Mittelwert, also $r_A = 0.165$ angenommen. Damit erhält man als minimalen Chromophorwinkel (d.h. der Winkel des Übergangsdipolmomentes zur Membrannormalen) $\theta_0 = 70.3^\circ$, was in etwa den Werten entspricht, die aus den Kippseifenexperimenten [Hey77, Lin89] und den Messungen an Mikrokristallen [Sch91] bestimmt wurden. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß durch das anisotrope Quellen eine perfekte Ordnung erreicht wurde. Folglich muß der Chromophorwinkel θ_0 sogar noch größer sein. J. Kappert [Kap96] hatte durch analoge Messungen an gepreßten Gelen sogar einen Minimalwinkel von $\theta_0 = 71.5^\circ$ gefunden. Eine Änderung des Chromophorwinkels, die auch mit einer Änderung der Proteinstruktur einhergehen müßte, ist durch die mechanischen Orientierungsprozeduren (anisotropes Quellen und Pressen) aber nicht anzunehmen, denn die spektroskopischen Eigenschaften (Licht-Dunkel-Adaptation und Photozyklus) sind ebenfalls unverändert.

5.4 Der blau–pink Übergang

Die Untersuchung des blau–pink Übergangs wurde an einer Probe durchgeführt, die durch anisotropes Quellen in einer Küvette mit Querschnitt $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ über einen Zeitraum von 6 Wochen in 15mM Essigsäure (pH2.6), aber in Abwesenheit von Salz, orientiert worden war. Da in einigen Vorversuchen festzustellen war, daß die blauen Membranen nicht im selben Maße photostabil sind wie die PM, erfolgte die Orientierungsprozedur im Dunkeln. Ebenso wurde auf Lichtadaptation vor der Messung im blauen Zustand verzichtet. Daher ist zu berücksichtigen, daß der hier gemessene blaue Zustand aus einem Isomergemisch von all–*trans* und 13–*cis* besteht, jedoch ist der Anteil in der all–*trans*–Konformation mit knapp 60% [Bal96a] wesentlich höher als in PM bei pH7. Da bei der Licht–Dunkel–Adaptation von PM keine Reorientierung des Übergangsdipolmomentes festgestellt wurde (siehe Kap. 5.2), ist anzunehmen, daß dies auch für die blauen Membranen zutrifft.

Abb. 5.9 zeigt die Extinktionsspektren (Polarisationswinkel $\theta = 0^\circ$) der Probe im Ausgangszustand (I), nach photoinduzierten Übergängen (II,IV) und im gebleichten Endzustand (V). Der Zustand (III) entsteht durch thermische Relaxation aus Zustand (II). Die Bande bei 380nm im Spektrum der blauen Membran (I) ist vermutlich nicht eine höhere Absorptionsbande des blauen Zustands, sondern einem anderen Chromophorzustand zuzuordnen. Dabei könnte es sich um freies Retinal handeln, d.h. die kovalente Bindung des Retinals zur Lysin–Seitenkette ist gebrochen. Durch Beleuchten mit „rotem“ Licht wird der Pink–Zustand (490nm –Bande) akkumuliert, jedoch ist an der Schulter der langwelligen Flanke des Spektrums (II) zu erkennen, daß der Übergang nicht vollständig abläuft, sondern noch eine Restbesetzung im blauen Zustand verbleibt. Die thermische Relaxation von Zustand (II) ist mit einer beträchtlichen Extinktionsabnahme der 490nm –Bande verbunden, während sich die Schulter (600nm –Bande) nur wenig vergrößert, und die 380nm –Bande aber nicht unwesentlich zunimmt. Offenbar findet aus dem Pink–Zustand eine Verzweigungsreaktion statt. Durch Beleuchten mit „blau–grünem“ Licht wird schließlich wieder der blaue

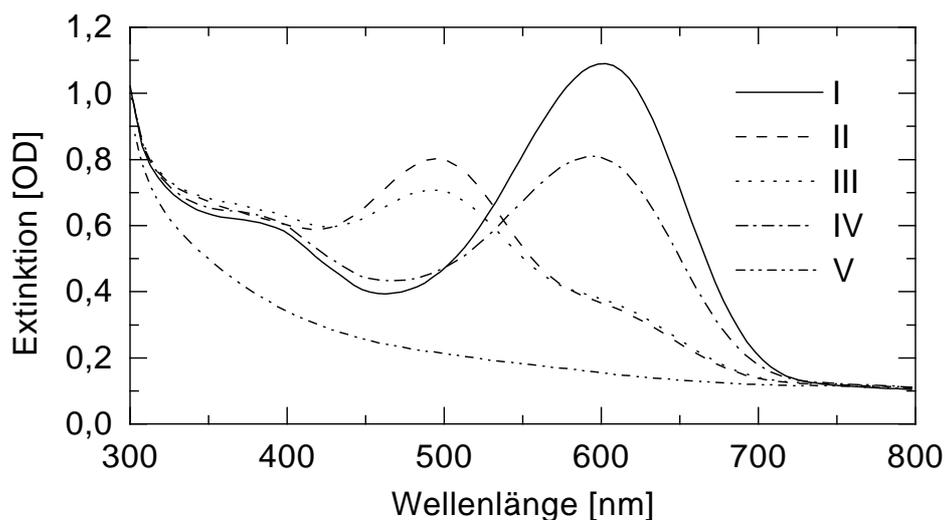


Abbildung 5.9: Extinktionsspektren einer durch anisotropes Quellen orientierten Probe (pH2.6) beim Polarisationswinkel $\theta = 0^\circ$. I: Dunkelzustand. II: nach 9 min. Beleuchten mit „rotem“ Licht, III: nach 4 h therm. Relaxation, IV: nach 6 min. Beleuchten mit „blau–grünem“ Licht, ausgehend vom Zustand III, V: nach Ausbleichung.

Zustand akkumuliert, wobei die Ausgangsbesetzung nur noch zu knapp zwei Drittel wieder erreicht wird, aber die 380nm -Bande erhöht ist. Die Übergänge zwischen den beteiligten Chromophorzuständen sind also nicht als vollständig reversibel zu betrachten.

Die polarisationsabhängigen Messungen wurden für die beiden äquivalenten, zueinander senkrechten, Lichtwege durch die Probe (und jeweils senkrecht zur Orientierungsachse) durchgeführt. Für den blauen Zustand (I) und den gebleichten Zustand (V) konnte die Extinktion $E(\lambda, \theta)$ für 14 Polarisationswinkel ($\theta = -20^\circ - 110^\circ$) gemessen werden. Wegen der thermischen Relaxation des Pink-Zustandes (II nach III) beschränkte sich die Messung auf nur 4 Polarisationswinkel ($\theta = 0^\circ, 90^\circ, 30^\circ, 60^\circ$), diese Sequenz wurde aber 5 Mal wiederholt und mit erneuter Messung von $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$ abgeschlossen. Die Dauer einer Messung war $2\frac{1}{2}$ Minuten, der zeitliche Abstand zur nächsten Messung betrug jeweils 4 bis $4\frac{1}{2}$ Minuten.

Die zeitliche Veränderung der Spektren ist in Abb. 5.10 gezeigt. Der starke Einfluß der Doppelbrechung ist auch hier, bei den Messungen unter $\theta = 30^\circ$ und $\theta = 60^\circ$, besonders im langwelligen und kurzwelligen Spektralbereich zu erkennen. Für jeden Polarisationswinkel wurde eine Extrapolation zum Zeitpunkt der ersten Messung durchgeführt. Da über einen Zeitraum von 240 Minuten gemessen wurde, die Zerfallskonstante des Pink-Zustands aber bei über 300 Minuten liegt, ist es gerechtfertigt zur Vereinfachung linear zu extrapolieren, statt das exponentielle Abklingen zu berücksichtigen. Für die Polarisationswinkel $\theta = 30^\circ$ und $\theta = 60^\circ$ wäre eine formal exakte Extrapolation sowieso nicht möglich, weil für diese Polarisationswinkel die gemessene Extinktion $E(\lambda, \theta)$ komplex (nicht linear) von der isotropen Extinktion $E_0(\lambda)$ abhängt. Die Ergebnisse der Extrapolation sind ebenfalls in Abb. 5.10 dargestellt. Der blaue Zustand (IV) wurde, nach Photokonversion aus dem Pink-Zustand (III), lediglich zur Kontrolle bei 4 Polarisationswinkeln ($\theta = 0^\circ, 90^\circ, 30^\circ, 60^\circ$) gemessen. Aus der Anpassung der polarisationsabhängigen Extinktionen $E(\lambda, \theta)$ in den drei Zuständen blau (I), pink (II-III) und gebleicht (V), mit Gl.(4.6) erhält man das in Abb. 5.11 dargestellte Ergebnis. Aus Gründen der Übersicht ist nur das Ergebnis für einen der beiden äquivalenten

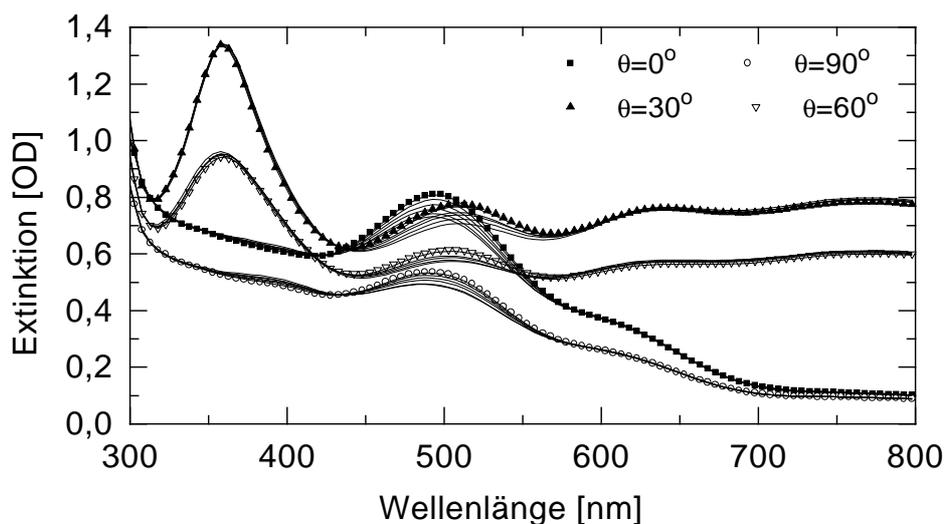


Abbildung 5.10: Extinktionsspektren der thermischen Relaxation des Pink-Zustandes bei 4 Polarisationswinkeln $\theta = 0^\circ, 90^\circ, 30^\circ, 60^\circ$. Symbole: Ergebnisse der Extrapolation zum Zeitnullpunkt der über 5nm Intervalle gemittelten Extinktionsspektren, Linien: Zeitliche Entwicklung der Extinktionsspektren.

Lichtwege gezeigt. Die Ergebnisse aus beiden Datensätzen, insbesondere die Absorptionsspektren und die zugehörigen Anisotropien, waren aber nahezu identisch. Bei dieser Probe wurde also eine fast perfekte uniaxiale Symmetrie erreicht.

Die Veränderung in den Spektren (Abb. 5.11a und b) durch Photokonversion und thermische Relaxation wurde oben schon diskutiert. Das Differenzspektrum zwischen blauem und Pink-Zustand (Abb. 5.11c) zeigt klar getrennte Absorptionsbanden. Zur Bestimmung des blauen Anteils im Spektrum A_0^p wurde A_0^b soweit herunterskaliert, bis die langwellige Flanke ($\lambda \geq 650\text{nm}$) mit ΔA übereinstimmt. Aus diesem Skalierungsfaktor ergibt sich, daß in A_0^p noch ca. 20% der ursprünglichen Besetzung an blauem Zustand enthalten ist. Die Chromophoranisotropie des blauen Zustandes (Abb. 5.11d) ist nahezu konstant über die Hauptabsorptionsbande ($r_A^b = 0.160 \pm 0.001$) und nimmt zum kurzwelligeren hin ab. Diese Abnahme könnte ein Hinweis darauf sein, daß das freie Retinal ungeordnet in den Membranen vorliegt. Die Anisotropie des Pink-Zustandes ist überlagert von den Beiträgen des blauen Zustandes und des freien Retinals, aber im Absorptionsmaximum bei $\lambda = 495\text{nm}$ sind diese Beiträge verhältnismäßig klein, und der Maximalwert von 0.175 sollte schon dicht am tatsächlichen Wert der Chromophoranisotropie im Pink-Zustand liegen. Die dem Differenzspektrum ΔA zugeordnete Anisotropie R ist für $\Delta A > 0$, d.h. im Bereich der Hauptabsorptionsbande des blauen Zustands, fast identisch mit mit r_A^b . Für $\Delta A < 0$ wird kein konstanter Wert erreicht, da die überlagerten Beiträge, insbesondere der vom blauen Zustand, in der Größe

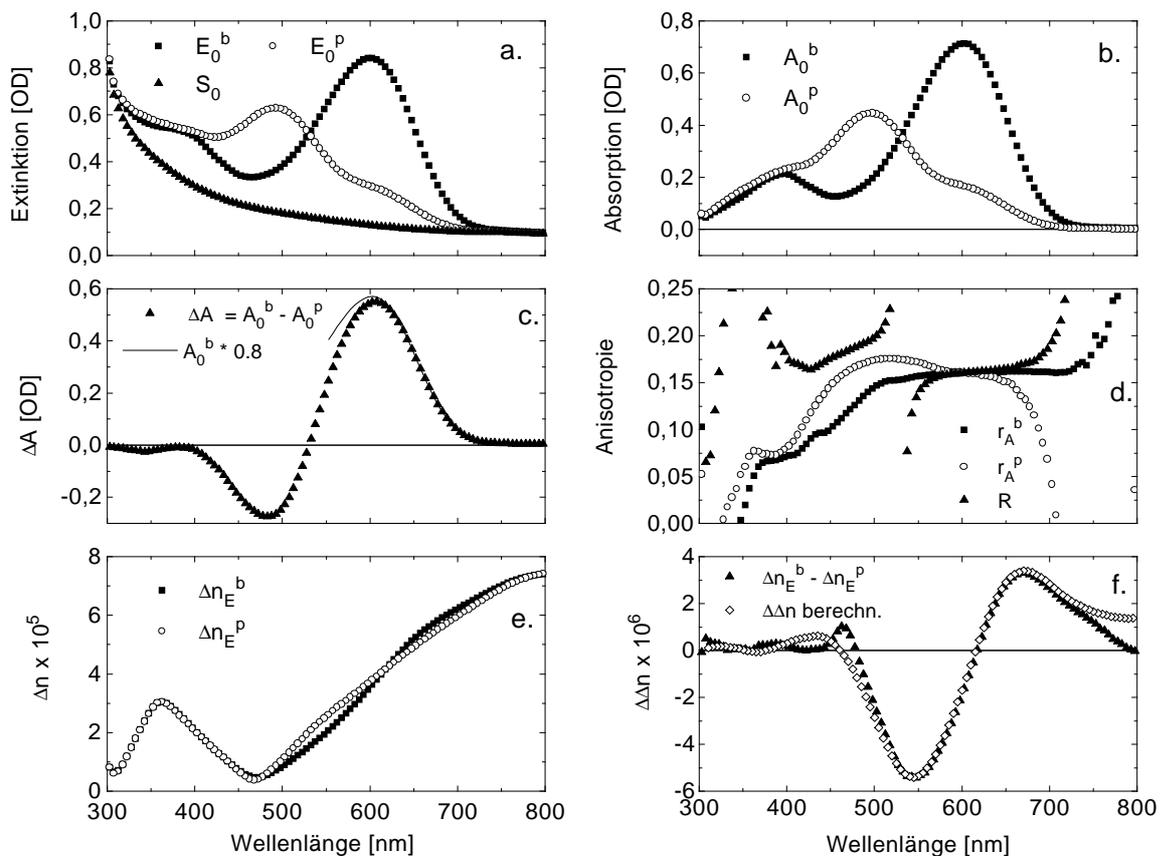


Abbildung 5.11: Ergebnisse aus der Anpassung der Meßdaten des orientierten Gels im blauen Zustand (Superskript b), im Pink-Zustand (Superskript p) und nach Ausbleichung. (a) Extinktion, (b) Absorption, (c) Differenzspektrum, (d) Anisotropie, (e) Lineare Doppelbrechung, (f) Chromophoranteil der Doppelbrechung.

R ein größeres Gewicht haben. Der spektrale Verlauf ist natürlich konsistent mit r_A^b und r_A^p . Berücksichtigt man also den Beitrag des blauen Zustandes mit 0.2 ergibt sich für die Chromophoranisotropie des Pink-Zustandes $r_A^p = 0.179 \pm 0.001$. Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß die Kontrollmessung im blauen Zustand (IV) im Rahmen der Meßgenauigkeit auf dieselbe Chromophoranisotropie führte wie im blauen Zustand (II). Damit ist sichergestellt, daß die Beleuchtung, durch die der Übergang von blau nach pink induziert wurde, tatsächlich hinreichend isotrop war. Durch anisotropes Beleuchten hätte eine Änderung in der Anisotropie als Artefakt auftreten können.

Der spektrale Verlauf der linearen Doppelbrechung (Abb. 5.11e) für die Zustände blau und pink erlaubt keinen Nulldurchgang bei etwa 450nm , wie die Messung von Kap. 5.3. Im Minimum beträgt die zugehörige Phasendifferenz $\Delta\phi_E$ noch etwa 17° , wobei die Genauigkeit bei der Bestimmung von kleinen Phasendifferenzen nicht sehr hoch ist. Ob hier ein Meßfehler vorliegt, oder aber der Knick im spektralen Verlauf eine Folge der Dynamik des Quellprozesses ist – nach 6 Wochen ist dieser möglicherweise noch nicht abgeschlossen –, hat wenig Bedeutung für die Aussagen über die Chromophorbeiträge. In Abb. 5.11f ist die Differenz $\Delta n_E^b - \Delta n_E^p$, mit der Berechnung aus $(A_0^b r_A^b - A_0^p r_A^p)$ über die Kramers-Kronig-Relation verglichen. Wieder zeigt sich sehr gute Übereinstimmung, abgesehen von den Spektralbereichen ($\lambda > 750\text{nm}$ und $\lambda < 500\text{nm}$), wo die Bestimmung der Phasendifferenz relativ ungenau ist, d.h. wenn $\Delta\phi_E$ nahe 0° oder 180° ist.

Unter der Annahme, daß der Winkel des Übergangsdipolmomentes bezüglich der Membrannormalen in der blauen Membran den gleichen Wert hat wie in PM, nämlich in etwa $\theta_b = 70^\circ$, so folgt unter Verwendung von Gl.(2.29) aus den oben bestimmten Anisotropien für den Pinkzustand ein Winkel von $\theta_p = 72.4 \pm 0.3^\circ$. Diese Änderung hängt geringfügig vom Wert von θ_b ab, der aber exakt nicht bekannt ist. Messungen an einer magnetisch orientierten Probe hatten für den purpur-blau Übergang eine geringfügige Winkeländerung von $\Delta\theta_b \approx +0.4^\circ$ ergeben. Allerdings war der spektroskopische Übergang bei diesem Experiment mit einem Chromophorverlust von über 50% verbunden, so daß das Ergebnis weniger aussagekräftig ist. Für $\theta_b = 68^\circ$ bzw. $\theta_b = 72^\circ$ würde sich eine Winkeländerung von $+2.0^\circ$ bzw. $+3.0^\circ$ ergeben. Diese relativ kleine Winkeländerung ist jedenfalls erstaunlich, in Anbetracht der Tatsache, daß der Blau-Pink-Übergang mit einer Isomerisierung der 9–10 Doppelbindung der Polyenkette des Retinals verbunden ist.

5.5 Der photostationäre M-Zustand

Der photostationäre M-Zustand wurde an magnetisch orientierten PM der Mutante D96A bei pH8.0 in der Blitzlichtapparatur untersucht. Der Grundzustand wurde für insgesamt 30 Wellenlängen (von 360nm bis 690nm) gemessen, während die Messung des M-Zustandes mit „gelbem“ Hintergrundlicht nur bei 15 Wellenlängen unterhalb von 500nm möglich war. Um aus diesen Messungen die Chromophorbeiträge zu erhalten, wurde für jede der o.g. Wellenlängen auch eine orientierte Probe gebleichter Membranen gemessen, die in etwa die gleiche Konzentration und den gleichen Ordnungsparameter hat. Die Extinktion $E(\lambda, \theta)$ wurde jeweils für 8 Polarisationswinkel ($\theta = -20^\circ, 0^\circ, 20^\circ, 40^\circ, 50^\circ, 70^\circ, 90^\circ, 110^\circ$) bestimmt. Die Meßlichtintensität wurde für $\lambda \geq 450\text{nm}$ auf bis zu 5% abgeschwächt, um durch das Meßlicht keine zusätzlichen Photoreaktionen zu induzieren. Die gebleichte Probe wurde stets unter denselben Bedingungen, d.h. mit gleicher Meßlichtintensität, gemessen.

Abb. 5.12 zeigt die polarisationsabhängige Extinktion $E(\lambda, \theta)$ der Probe im Grundzustand und im photostationären M-Zustand exemplarisch bei zwei Wellenlängen. Während bei

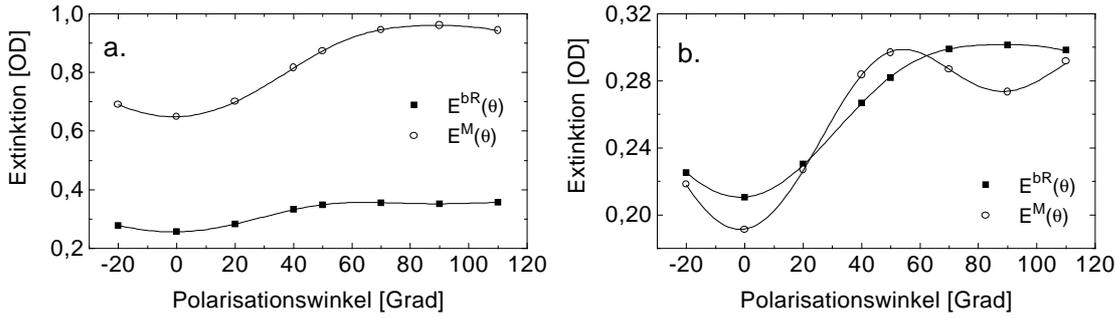


Abbildung 5.12: Polarisationsabhängige Extinktion $E(\lambda, \theta)$ eines magnetisch orientierten Gels (D96A, pH8.0), im Grundzustand und im photostationären M-Zustand. (a) $\lambda = 410nm$. (b) $\lambda = 460nm$.

$\lambda = 410nm$ eine drastische Zunahme der Extinktion für alle Polarisationswinkel im Übergang zum M-Zustand zu sehen ist, gibt es bei $\lambda = 460nm$ positive und negative Änderungen. Dies ist bedingt durch eine relativ kleine Änderung in der Absorption² und einer großen Änderung in der Phasendifferenz ($\Delta\Delta\phi = 18.4^\circ$). Die Anpassung der polarisationsabhängigen Extinktion $E(\lambda, \theta)$ erfolgte mit Gl.(4.6). Die Chromophorbeiträge A_0 , r_A und Δn_A lassen sich dann für den bR-Grundzustand und den M-Zustand jeweils mit Gl.(4.7) ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.13 dargestellt, wobei die linke Spalte (a, c, e) die Ergebnisse der Anpassung enthält, und in der rechten Spalte (b, d, f) die Chromophorbeiträge aufgetragen sind. Das Extinktionsspektrum im Grundzustand E_0^{bR} und der Streuuntergrund S_0 (Abb. 5.13a) sind nahezu identisch mit den Messungen im Spektrophotometer (vgl. Abb. 5.3a, Kap. 5.1). Das Spektrum des M-Zustandes hat wie erwartet sein Maximum bei $410nm$ (Abb. 5.13a, Abb. 5.13b). Das Verhältnis der Absorptionsmaxima $A_0^M(410nm)/A_0^{bR}(570nm)$ beträgt etwa 0.72, in guter Übereinstimmung mit den Experimenten, bei denen der M-Zustand bei $-40^\circ C$ eingefangen wurde [Bec78]. Im Wellenlängenbereich von $450nm$ bis $500nm$ gibt es jedoch signifikante Unterschiede: Während der eingefangene M-Zustand [Bec78] einen verbreiterten „Fuß“ aufweist und bei $500nm$ noch deutlich abfällt, zeigt der photostationäre M-Zustand (Abb. 5.13b) kaum noch Änderung in der Absorption für $\lambda \geq 480nm$. Der noch deutlich von null verschiedene Absorptionswert bei $\lambda = 500nm$ ($\approx 25mOD$), läßt vermuten, daß die ausgebleichte Probe keine perfekte Referenz darstellt.

Die Extinktionsanisotropie (Abb. 5.13c) zeigt für die Chromophorzustände bR und M im Bereich ihrer Absorptionsmaxima einen deutlichen Unterschied ($r_E^{bR}(570nm) \approx -0.145$, $r_E^M(570nm) \approx -0.120$), wobei die Unterschiede im Streuuntergrund zu berücksichtigen sind. Die Anisotropie der gebleichten Probe r_S ließ sich leider nur sehr ungenau bestimmen. Da die Intensität des Meßlichtes gegenüber Standardmessungen reduziert werden mußte, war es nötig, den Photomultiplier bei höheren Spannungen zu betreiben, damit das Ausgangssignal noch meßbar ist. Offenbar ist der Photomultiplier dann aber nicht mehr im linearen Bereich. Durch die Verwendung des $\lambda/2$ -Plättchens im Meßstrahlengang (siehe Kap. 3.2.2) läßt sich dieser Artefakt vermindern, allerdings nur für die entsprechenden Wellenlängen, bei denen der richtige Gangunterschied entsteht. Auf diese Weise ergibt sich dann in der Anisotropie r_S ein quasi periodisches Verhalten. Trotzdem konnten die Chromophoranisotropien r_A^{bR} und r_A^M noch verläßlich bestimmt werden (Abb. 5.13d). Im Bereich des jeweiligen Absorptionsmaximums ergeben sich nur geringe Schwankungen um einen Mittelwert ($\bar{r}_A^{bR} = -0.148 \pm 0.001$

²Der isosbestische Punkt zwischen Grundzustand und M soll bei $457nm$ liegen

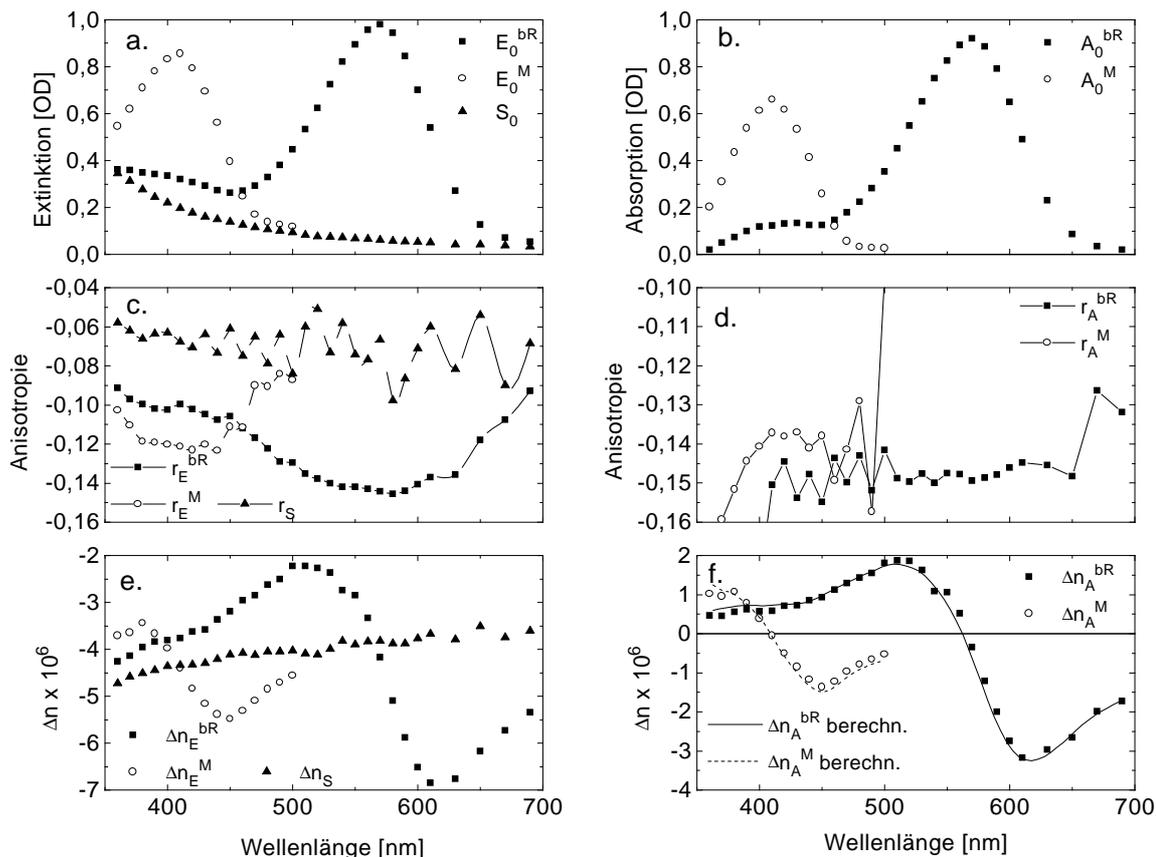


Abbildung 5.13: Ergebnisse aus der Anpassung der Meßdaten des magnetisch orientierten Gels (D96A, pH8.0), im Grundzustand und im photostationären M-Zustand. (a) Extinktion, (b) Absorption, (c) Extinktionsanisotropie (d) Absorptionsanisotropie, (e) Lineare Doppelbrechung, (f) Chromophoranteil der Doppelbrechung.

und $\bar{r}_A^M = -0.137 \pm 0.002$). Die Chromophoranisotropie des bR-Grundzustandes r_A^{bR} weist starke Schwankungen im Bereich der höheren Absorptionsbanden ($400\text{nm} < \lambda < 500\text{nm}$) auf, doch im Mittel ergibt sich in etwa der gleiche Wert wie im Wellenlängenbereich der Hauptabsorptionsbande ($\bar{r}_A^{bR} = -0.147 \pm 0.009$). Da der M-Zustand beim photostationären Experiment nahezu vollständig akkumuliert wurde, spielt die Grundzustandsanisotropie im Absorptionsbereich von M keine Rolle. Bei den zeitaufgelösten Experimenten muß die Überlagerung des bR-Grundzustandes aber immer berücksichtigt werden. Nach den Ergebnissen der Gleichlichtmessung ist es gerechtfertigt, eine über den ganzen betrachteten Wellenlängenbereich konstante Grundzustandsanisotropie anzusetzen.

Unter der Annahme von $\theta_{bR} = 70^\circ$ folgt mit Gl.(2.29) aus den mittleren Anisotropiewerten der Winkel des Übergangsdipolmomentes im photostationären M-Zustand $\theta_M = 68.6 \pm 0.3^\circ$. Dieses Ergebnis ist wiederum in guter Übereinstimmung mit den Experimenten an Mikrokristallen [Sch91], die eine Winkeländerung von $\Delta\theta_M = -2.2^\circ \pm 0.5^\circ$ für den photostationären M-Zustand der Mutante D96N ergeben hatten. Die Messungen an Purpurmembranen bzw. an Mikrokristallen sind aber nur bedingt vergleichbar (siehe Kap. 5.2).

Die lineare Doppelbrechung (Abb. 5.13e) für den bR-Grundzustand Δn_E^{bR} und für die gebleichten Membranen Δn_S sind ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Messungen im Spektrophotometer (vgl. Abb. 5.3c, Kap. 5.1). Der Chromophorbeitrag im M-Zustand Δn_A^M ist im Extremum bei 450nm nur knapp halb so groß wie Δn_A^{bR} im entsprechenden Extre-

mum bei 610nm . Für beide Chromophorzustände liefern die Kramers–Kronig–Relationen Gl.(2.72), unter Verwendung konstanter Anisotropien ($r_A^{bR} = -0.148$ und $r_A^M = -0.137$), eine gute Bestätigung der experimentellen Daten. Die geringen, aber für $\lambda \geq 410\text{nm}$ systematischen, Abweichungen von Δn_A^M bezüglich der berechneten Kurve können darauf hindeuten, daß die Anisotropie des M–Zustandes möglicherweise vom Betrag etwas kleiner ist, als dies aus r_A^M (Abb. 5.13d) geschlossen wurde.

5.6 Übersicht zur Chromophororientierung stationärer Zustände

Durch das hier eingeführte Meßverfahren sind Lineardichroismus und lineare Doppelbrechung als unabhängige Meßgrößen zugänglich. Da die Chromophorbeiträge über die Kramers–Kronig–Relationen verknüpft sind, liefert die lineare Doppelbrechung äquivalente Information und ermöglicht daher die Ergebnisse des Lineardichroismus zu überprüfen. Die Orientierung des elektronischen Übergangsdipolmoments bezüglich der Membrannormalen konnte für stationäre Chromophorzustände so mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Unter der Voraussetzung, daß die Richtung des Übergangsdipolmoments durch die Enden des konjugierten π –Elektronensystems gegeben ist, läßt sich bei bekannter Konformation (Isomerisierungszustand) des Chromophors ein räumliches Modell der Chromophororientierung konstruieren. Abb. 5.14 zeigt die wahrscheinliche Chromophororientierung in den Konformationen *all-trans*, *15-anti* (lichtadaptierter Zustand), *13-cis*, *15-syn* (im dunkel-

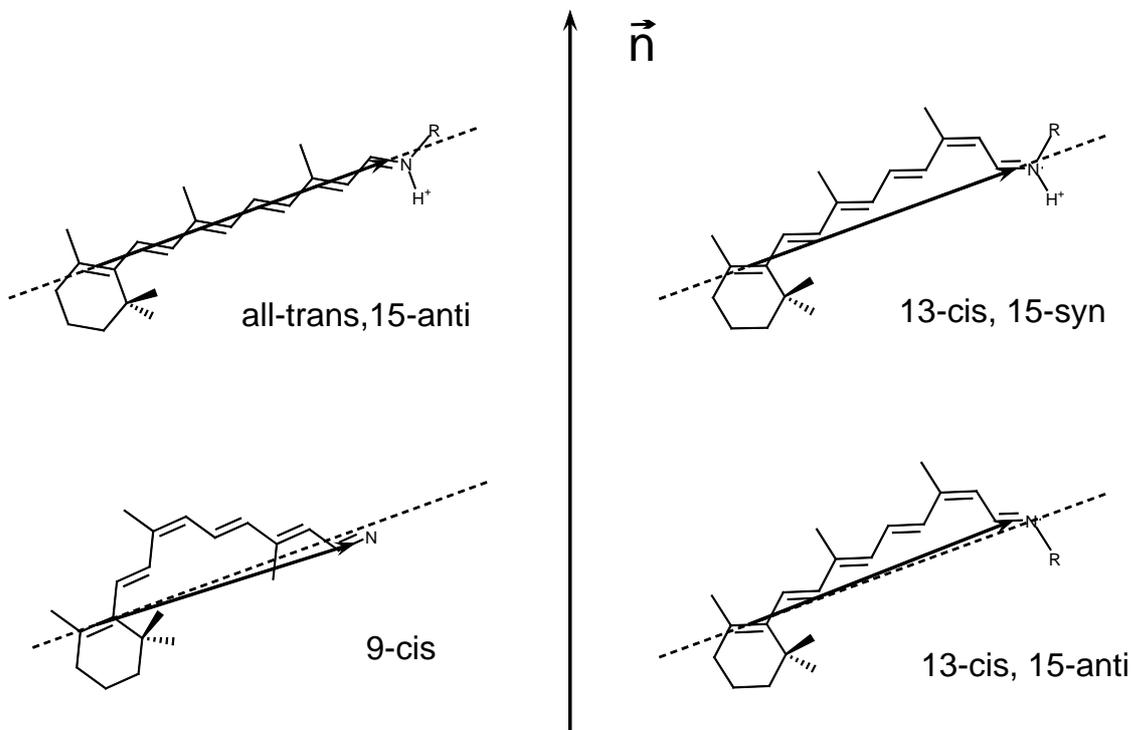


Abbildung 5.14: Chromophororientierung bezüglich der Membrannormalen (\vec{n}) für verschiedene Isomerisierungszustände. Die Richtung des Übergangsdipolmoments ist durch Vektorpfeile angegeben, die gestrichelte Linie gibt die Orientierung in der *all-trans*, *15-anti* Konformation an ($\theta_{bR} = 70^\circ$).

adaptierten Zustand enthalten), 13-*cis*, 15-*anti* (photostationärer M-Zustand) und 9-*cis* (Pink-Zustand). Für den Pinkzustand ist die Konformation der C₁₅-N-Doppelbindung nicht bekannt bzw. nicht in der Literatur erwähnt. Aufgrund von Erkenntnissen aus Neutronendiffraktionsexperimenten [Hau94] wurde die Lage des β -Iononrings festgehalten. Da die Orientierung des Übergangsdipolmoments sich trotz Isomerisierung nur wenig ($\Delta\theta_p = +2.4^\circ$ und $\Delta\theta_M = -1.4^\circ$) oder gar nicht (Licht-Dunkel-Adaptation) ändert, kann sich auch die Lage des N-Atoms nur wenig ändern. Dagegen erfährt die Polyenkette zwischen dem β -Iononring und der SB eine große Auslenkung, d.h. bei der 13-*cis* Isomerisierung kippt der C₅-C₁₃-Verbindungsvektor um ca. 10° zur Membrannormalen, bei der 9-*cis* Isomerisierung wird der C₅-C₉-Verbindungsvektor sogar um etwa 35° gekippt. Sterische Wechselwirkung zwischen der C₁₉-Methylgruppe und den Seitenketten von Trp-182 bzw. Leu-93, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft befinden [Lue98], könnte die Ursache sein, daß der Pink-Zustand thermisch nicht völlig stabil ist. Sowohl bei der 13-*cis* als auch bei der 9-*cis* Isomerisierung wird der Abstand der SB zum β -Iononring verkürzt, so daß auf die Seitenkette von Lys-216 eine Zugspannung ausgeübt wird. Bei der 13-*cis*, 15-*anti* Konformation wird dieser Effekt offenbar noch erheblich verstärkt, so daß eine über die Lys-216 Seitenkette vermittelte Wechselwirkung zwischen Chromophor und Protein möglicherweise sogar funktionell für den Protonentransport relevant ist.

