

Kapitel 7

Die frühen Photozyklusintermediate

7.1 Experimente am nativen System: Magnetisch orientierte PM

Zur Untersuchung der frühen Photozyklusintermediate von wt-bR waren neutraler pH-Wert (pH7) und niedrige Temperatur ($T = 10^\circ\text{C}$) die geeigneten Bedingungen. Bei neutralem pH besitzt das Protein eine außerordentlich hohe Photostabilität, was für die umfangreichen polarisationsabhängigen Messungen von großer Wichtigkeit war. Die niedrige Temperatur verlangsamt den Zerfall des K-Intermediates, der so besser zeitlich aufzulösen ist, und vermeidet die Artefakte der Überlagerung des 13-*cis* Zyklus (siehe Kap. 6.5.3). Die magnetisch orientierten PM-Proben sind optisch sehr homogen – das transmittierte Licht erleidet nur geringe Streuverluste – und daher für die zeitaufgelösten Experimente bestens geeignet.

Für die hier dargestellten Ergebnisse wurde bei 11 verschiedenen Wellenlängen (410nm, 460nm, 490nm, 520nm, 543nm, 570nm, 590nm, 610nm, 635nm, 650nm, 670nm) gemessen. Da die Intermediate K und L im Vordergrund der Betrachtung standen, und für die Bestimmung der $\tilde{\mathbf{C}}$ -Matrix sowieso nur die Daten bei $\lambda \geq 500\text{nm}$ zu berücksichtigen sind (siehe Kap. 4.2.3), waren zusätzliche Messungen bei kürzeren Wellenlängen nicht erforderlich. Bei den angegebenen Wellenlängen wurde jedoch mit hoher Genauigkeit gemessen: Bei jeder dieser Wellenlängen wurde die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ für 14 Polarisationswinkel ($\theta = -20^\circ, \dots, 110^\circ$) aufgenommen, mit zusätzlichen Messungen bei $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$ am Anfang und am Ende der Winkelserie. Zwischen den Messungen bei verschiedenen Wellenlängen erfolgte eine Kontrollmessung bei $\lambda = 570\text{nm}$ für $\theta = 0^\circ$ und $\theta = 90^\circ$, um nachträglich eine Korrektur bezüglich der sich eventuell verändernden Anregungsbedingungen durchführen zu können (siehe Kap. 6.2). Bei jeder gemessenen Zeitspur $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ wurde über jeweils 30 bis 50 Einzelblitze gemittelt, und anschließend erfolgte eine Reduktion auf 10 Datenpunkte pro logarithmische Dekade.

Die polarisationsabhängige Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ ist in einer Höhenliniendarstellung für die Wellenlängen $\lambda = 635\text{nm}$ (Abb. 7.1a) und $\lambda = 460\text{nm}$ (Abb. 7.1c) gezeigt. Bei diesen Wellenlängen tritt der Einfluß der transienten Doppelbrechungsänderung besonders deutlich hervor. Unmittelbar nach der Lichtanregung sind die Extrema bei $\theta = 90^\circ$ lokalisiert, bedingt durch einen großen Beitrag des Lineardichroismus ($\Delta A(t) R(t)$) und nur geringe Doppelbrechungsänderungen $\Delta \Delta n(t)$. Im zeitlichen Verlauf bilden sich aber Extrema bei $\theta \approx 50^\circ$ aus, die auf erhebliche Doppelbrechungsänderungen zurückzuführen sind. Eine Anpassung der Datenfelder mit Gl.(4.10) liefert nur geringe Abweichungen, die im frühen Zeitbereich maximal $\pm 3mOD$ betragen und mit fortschreitender Zeit abnehmen, da

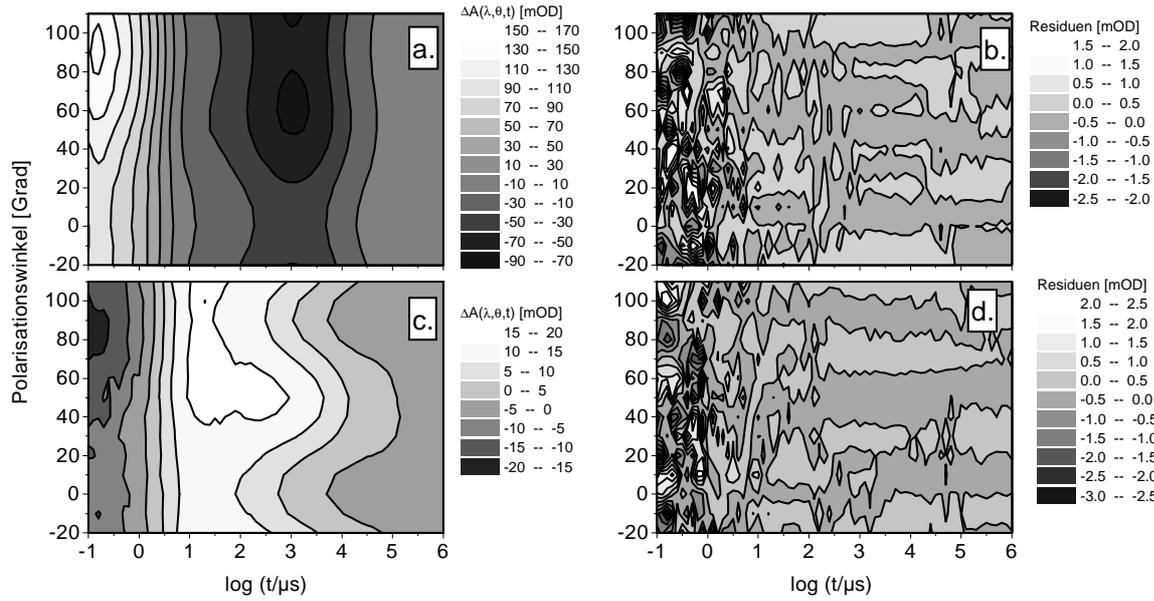


Abbildung 7.1: Höhenliniendarstellung der polarisationsabhängigen Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ einer magnetisch orientierten Probe, $S_2 \approx 0.47$, $\text{pH}7.0$, $T = 10^\circ\text{C}$. (a) $\lambda = 635\text{nm}$, (b) Abweichungen der Daten aus (a) vom Fit mit Gl.(4.10), (c) $\lambda = 460\text{nm}$, (d) Abweichungen der Daten aus (c) vom Fit mit Gl.(4.10).

die logarithmische Datenreduktion bereits eine derartige Glättung der Daten bewirkt hat. Die Abweichungen der Meßdaten bezüglich der Anpassung sind für die beiden Wellenlängen 635nm (Abb. 7.1b) und 460nm (Abb. 7.1d) ebenfalls als Höhenliniendarstellung gezeigt. Zur Verdeutlichung der beteiligten Effekte – transienter Lineardichroismus und transiente Doppelbrechungsänderung – sind aus den Datenfeldern von Abb. 7.1a bzw. Abb. 7.1c jeweils drei Zeitpunkte herausgegriffen, bei denen die Absorptionsänderung in Abhängigkeit des Polarisationswinkels betrachtet wird (Abb. 7.2). Die Streuung der Datenpunkte um die Fitkurve ist für $\lambda = 635\text{nm}$ (linke Spalte von Abb. 7.2) viel kleiner als für $\lambda = 460\text{nm}$ (rechte Spalte von Abb. 7.2), da die absoluten Abweichungen in der gleichen Größenordnung liegen (vgl. Abb. 7.1b und Abb. 7.1d), die Signale bei $\lambda = 635\text{nm}$ aber erheblich größer sind als bei $\lambda = 460\text{nm}$. Für den Zeitpunkt $t = 140\text{ns}$ (Abb. 7.2a und Abb. 7.2b) ist die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ eine monotone Funktion des Polarisationswinkels θ im Bereich von $0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$, entsprechend gering ist der Beitrag der Doppelbrechungsänderung. Die Fitkurve (durchgezogene Linien in Abb. 7.2) weicht nur wenig von der Kurve ab, die eine fiktive Abhängigkeit in Abwesenheit von transienter Doppelbrechungsänderung beschreibt (gestrichelte Linien in Abb. 7.2).

Für die späteren Zeitpunkte $t = 14\mu\text{s}$ (Abb. 7.2c und Abb. 7.2d) und $t = 1.4\text{ms}$ (Abb. 7.2e und Abb. 7.2f) weist die Absorptionsänderung beim Polarisationswinkel $\theta \approx 50^\circ$ Minima bzw. Maxima auf, die durch große Beiträge der Doppelbrechungsänderung zum Meßsignal bedingt sind. Diesen Doppelbrechungsänderungen entsprechen Änderungen in der Phasendifferenz $\Delta\Delta\phi(t)$ von bis zu $\pm 6^\circ$. Bei geringen Absorptionsänderungen $\Delta A(\lambda, t)$, wie z.B. bei der Wellenlänge 460nm , die nahe des isobestischen Punktes von Grundzustand und M-Intermediat liegt, liefert die Doppelbrechungsänderung für $\theta = 50^\circ$ sogar den dominanten Beitrag im Meßsignal $\Delta A(\lambda, \theta, t)$. Die gute Übereinstimmung der Anpassung mit den Meßdaten zeigt, daß auch die zeitaufgelösten Experimente durch eine Überlagerung von Li-

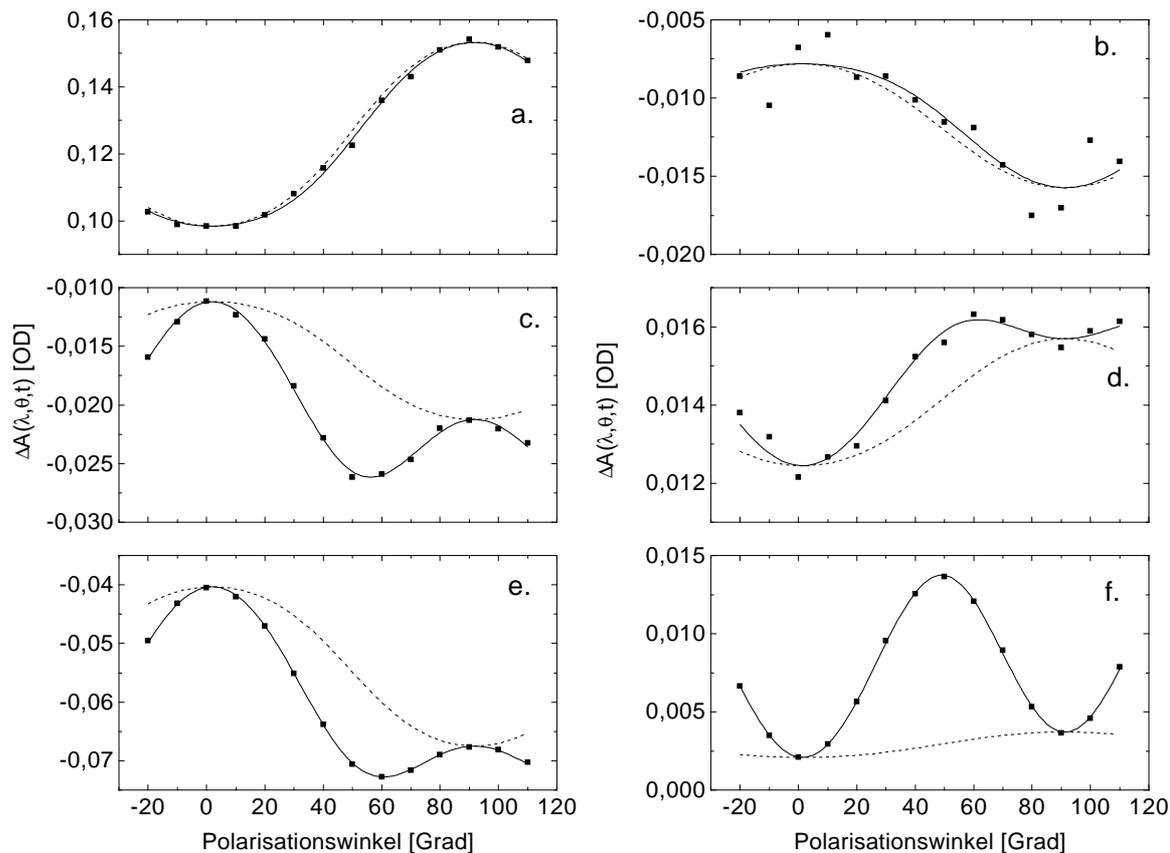


Abbildung 7.2: Ausschnitte der Datenfelder aus Abb.7.1a und 7.1c. Linke Spalte (a,c,e): $\lambda = 635\text{nm}$, Rechte Spalte (b,d,f): $\lambda = 460\text{nm}$. (a,b) $t = 140\text{ns}$, (c,d) $t = 14\mu\text{s}$, (e,f) $t = 1.4\text{ms}$. — Fitkurven, - - - - fiktive Abhängigkeit in Abwesenheit von transienter Doppelbrechungsänderung.

neardichroismus und linearer Doppelbrechung beschrieben werden können. Die Anpassung des dreidimensionalen Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Gl.(4.10) liefert als Ergebnis die (isotrope) Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, den transienten Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und die transiente Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$. Mit den aus den Kontrollmessungen bei 570nm ermittelten Korrekturfaktoren k_{\parallel} und k_{\perp} wurden die Zeitspuren bei den unterschiedlichen Wellenlängen unter Verwendung der Gln.(6.1,6.2,6.4) aufeinander abgeglichen. Das Ergebnis ist in Abb. 7.3 dargestellt, wobei zur besseren Übersicht fünf Wellenlängen ausgewählt wurden.

Da die Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ auf den ersten Blick proportional erscheinen, wurde auch die transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$ dargestellt (Abb. 7.3c), die jedoch ein charakteristisches Verhalten zeigt. Eine exakte quantitative Interpretation kann aus den einzelnen Anisotropiezeitspuren nicht abgeleitet werden, da weder die Spektren der Intermediate, noch deren kinetische Parameter als bekannte Größen vorauszusetzen sind. Einige qualitative Aussagen über die Intermediatsanisotropien ergeben sich dennoch aus den Zeitspuren $R(\lambda, t)$, in Verbindung mit den zugehörigen Absorptionsänderungen $\Delta A(\lambda, t)$. Zur besseren Übersicht sind in Abb. 7.3c die interessanten Bereiche durch Kästchen markiert. Die Singularitäten der Anisotropiezeitspuren sind mit den Nulldurchgängen von $\Delta A(\lambda, t)$ korreliert und deswegen nicht relevant. Die folgenden qualitativen Ergebnisse lassen sich aus der transienten Anisotropie ableiten: (1) Im Zeitbereich von etwa 1ms erreichen die Zeitspuren II bis V

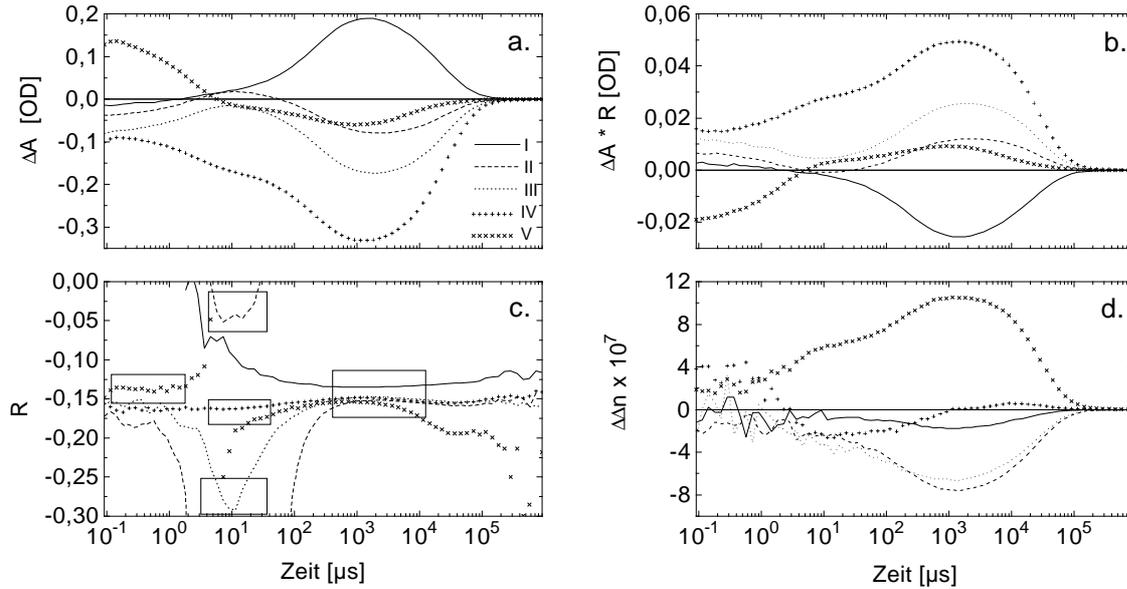


Abbildung 7.3: Ergebnis der Anpassung des Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Gl.(4.10) für fünf ausgewählte Wellenlängen. I: 410nm, II: 490nm, III: 520nm, IV: 570nm, V: 635nm. (a) (isotrope) Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, (b) transienter Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$, (c) transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$, (d) transiente Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$.

($\lambda \geq 490nm$) ungefähr denselben Wert von -0.15 , der vermutlich dicht an der Grundzustandsanisotropie r_{bR} liegt. Der vom Betrag kleinere Wert der Zeitspur I ($\lambda = 410nm$) weist in Verbindung mit der positiven Absorptionsänderung ($\Delta A(410nm, 1ms) > 0$) darauf hin, daß auch die Anisotropie des M-Intermediates betragsmäßig kleiner ist als die des Grundzustandes. (2) Das gleiche Argument greift auch für das K-Intermediat, betrachtet man Zeitspur V ($\lambda = 635nm$) im Zeitbereich von $200ns$ bis $2\mu s$. (3) Für das L-Intermediat sind die Zeitspuren II bis IV ($490nm$, $520nm$ und $570nm$) in einem Zeitfenster bei etwa $10\mu s$ relevant. Unter der Annahme, daß in diesem Zeitbereich nur das L-Intermediat maßgeblich ist, vereinfacht sich der Ausdruck für die transiente Anisotropie zu $R = (A_L r_L - A_{bR} r_{bR}) / (A_L - A_{bR})$. Aus den Relationen

$$\begin{aligned} \Delta A(490nm, 10\mu s) > 0 > \Delta A(520nm, 10\mu s) \gg \Delta A(570nm, 10\mu s) \\ R(490nm, 10\mu s) \gg r_{bR} > R(570nm, 10\mu s) \gg R(520nm, 10\mu s) \end{aligned}$$

läßt sich dann der Schluß ziehen, daß $0 > r_L > r_{bR}$, also daß die Anisotropie des L-Intermediates ebenfalls betragsmäßig kleiner ist als r_{bR} .

Die Zeitspuren der transienten Doppelbrechungsänderung (Abb. 7.3d) sind in den ersten zwei Zeitdekaden ziemlich verrauscht, doch im weiteren Verlauf ($t \geq 10\mu s$) ergeben sich glatte Kurven mit ähnlicher kinetischer Charakteristik wie bei der Absorptionsänderung und beim transienten Lineardichroismus. Mit der Kramers-Kronig-Relation (Gl.(4.14)) läßt sich die spektrale Abhängigkeit der Doppelbrechungsänderung aus dem Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ für diskrete Zeitpunkte berechnen und mit den Daten, die direkt aus der Anpassung der Polarisationswinkelabhängigkeit gewonnen wurden, vergleichen. Dieser Vergleich wurde für zwei Zeitpunkte, $t = 14\mu s$ und $t = 1.4ms$, durchgeführt (Abb. 7.4). Da die Berechnung des Hauptwertintegrals äquidistante Stützstellen erfordert, wurden $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ durch einen Splinefit an die Datenpunkte in Abständen von $5nm$ interpoliert. Im kurzwelligen Spektralbereich fehlt natürlich wichtige Information, so daß die

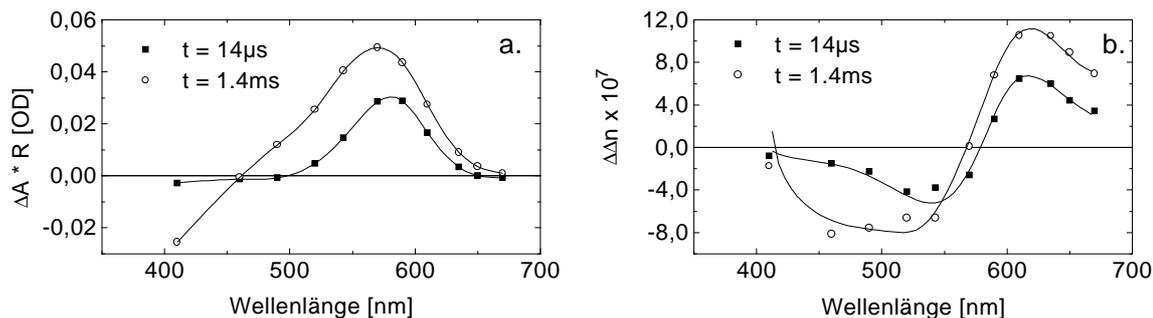


Abbildung 7.4: Spektrale Abhängigkeit (a) des Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und (b) der Doppelbrechungsänderung $\Delta \Delta n(\lambda, t)$ für $t = 14 \mu s$ (■) und $t = 1.4 ms$ (○). Symbole: Datenpunkte, — in (a): Splinesfits an die Datenpunkte, — in (b): Berechnung mit der Kramers-Kronig-Relation Gl.(4.14) aus den Splinesfits von (a).

berechnete Vergleichskurve mit systematischen Fehlern behaftet ist. Diese Fehler wirken sich aber offenbar nicht auf den ganzen Spektralbereich aus, sondern führen lediglich zu Abweichungen für $\lambda < 570 nm$ (Abb. 7.4b). In diesem Spektralbereich kommt hinzu, daß die Phasendifferenzen im Grundzustand $\Delta \phi_E(\lambda)$, die als feste Parameter in die Anpassung mit Gl.(4.10) eingehen, wegen ihres geringen Betrages (15° bis 20°) nur entsprechend ungenau aus der Gleichlichtmessung bestimmt werden konnten. Im langwelligen Spektralbereich ergibt sich aber eine recht gute Übereinstimmung, die zeigt, daß die Daten intrinsisch konsistent sind.

Für die weitere Auswertung wurden nur die Absorptionsänderungen $\Delta A(\lambda, t)$ und der transiente Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ verwendet, da die transienten Doppelbrechungsänderungen $\Delta \Delta n(\lambda, t)$ im vorderen Zeitbereich zu verrauscht sind und außerdem keine zusätzliche Information liefern. Mit geeigneten Modellfunktionen (Gln.(4.18,4.19)), wurde nun durch Variation von Zeitkonstanten, Exponenten (in den Potenzgesetzen) und Amplituden eine globale Anpassung an die Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ durchgeführt. Da die ersten Datenpunkte der Zeitspuren im langwelligen Spektralbereich noch vom Abklingen des Blitzdurchschlages überlagert sind, wurden diese frühen Zeitpunkte ($t < 180 ns$) für die Anpassung nicht berücksichtigt. Verschiedene Kombinationen von Potenzgesetzen und Exponentialfunktionen wurden für die Modellfunktion angesetzt, wobei die beste Anpassung mit einer minimalen Anzahl von freien Parametern mit zwei Potenzgesetzen ($\tau_1 = 2.1 \mu s$, $n_1 = 3.1$ und $\tau_2 = 208 \mu s$, $n_2 = 2.1$) und drei Exponentialfunktionen ($\tau_3 = 3.6 ms$, $\tau_4 = 26 ms$ und $\tau_5 = 88 ms$) erreicht wurde. Eine größere Anzahl von kinetischen Komponenten, beispielsweise durch Ersetzen eines Potenzgesetzes durch zwei Exponentialfunktionen, führte zu keiner wesentlichen Verbesserung.

Die aus der Anpassung resultierenden Amplitudenspektren (\mathbf{B}^A und \mathbf{B}^R) sind in Abb. 7.5 dargestellt. Abb. 7.6 zeigt die Abweichungen der Anpassung von den Datenfeldern $\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ als Höhenliniendarstellung. Im langwelligen Spektralbereich gibt es für kurze Zeiten relativ große Abweichungen ($6 - 7 mOD$) bei der Absorptionsänderung (Abb. 7.6a). Diese Abweichungen sind aber möglicherweise ein Artefakt des Blitzdurchschlages, der in diesem Spektralbereich einen besonders großen Effekt verursacht. Daher schien die Hinzunahme von einer weiteren kinetischen Komponente in diesem Zeitbereich nicht gerechtfertigt. In den restlichen Bereichen betrug die Abweichungen bezüglich $\Delta A(\lambda, t)$ nur $\pm 2 mOD$. Die Abweichungen beim transienten Lineardichroismus (Abb. 7.6b) sind absolut betrachtet wesentlich kleiner als bei der Absorptionsänderung, was auf die Größenordnung

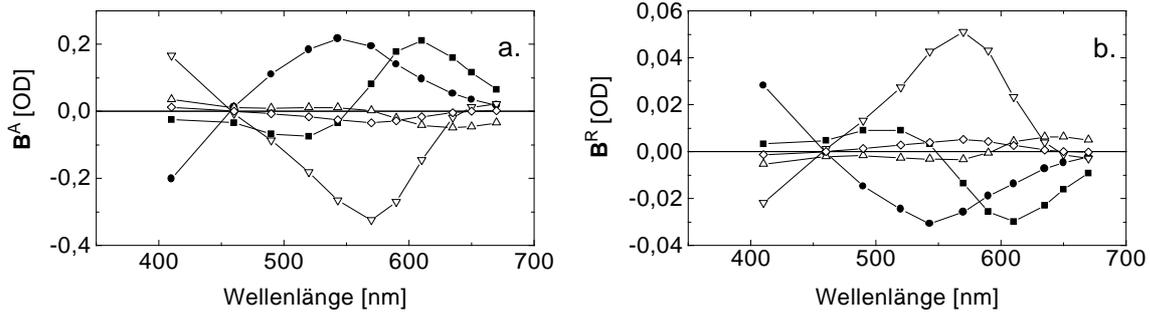


Abbildung 7.5: Ergebnis der globalen Anpassung: Amplitudenspektren (a) B^A , (b) B^R . Kinetische Komponenten, ■ : $\tau_1 = 2.1\mu s$, $n_1 = 3.1$, ● : $\tau_2 = 208\mu s$, $n_2 = 2.1$, △ : $\tau_3 = 3.6ms$, ▽ : $\tau_4 = 26ms$, ◇ : $\tau_5 = 88ms$.

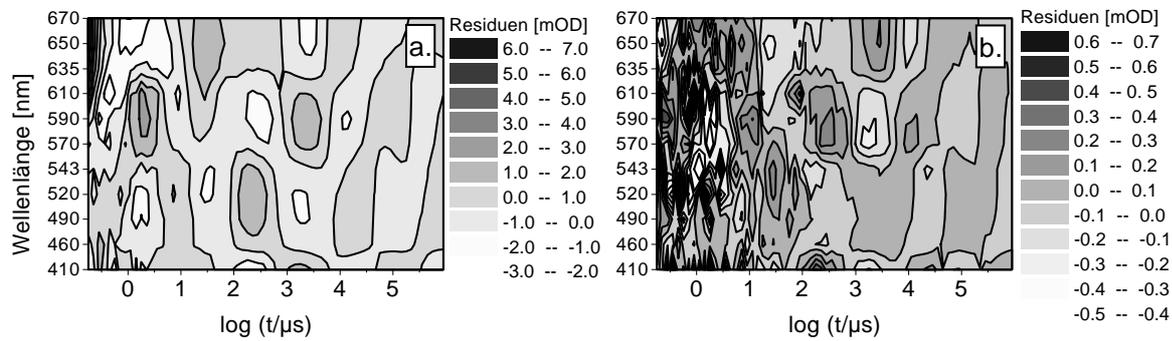


Abbildung 7.6: Höhenliniendarstellung der Residuen der globalen Anpassung von (a) $\Delta A(\lambda, t)$ und (b) $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$. Die Wellenlängenskala ist nichtlinear.

der Anisotropie zurückzuführen ist. Die relativen Abweichungen sind jedoch im vorderen Zeitbereich (bis etwa $100\mu s$) erheblich größer.

Im nächsten Schritt wurden die asymptotischen Differenzspektren durch bestimmte Summationen über die Amplitudenspektren gebildet (siehe Gl.(4.24)), was algebraisch formuliert Linearkombinationen der Spalten von B^A bzw. B^R entspricht. Das erste Differenzspektrum ($k = 1$) ist die Summation über alle Amplituden ($j = 1, \dots, 5$), im zweiten fehlt die erste Amplitude ($j = 2, \dots, 5$), und im dritten tragen nur die letzten drei Amplituden bei ($j = 3, \dots, 5$). Diese asymptotischen Differenzspektren, die den Spalten der Matrizen \tilde{B}^A bzw. \tilde{B}^R entsprechen sind in Abb. 7.7, zusammen mit den zugehörigen Anisotropien $\tilde{R} := \tilde{B}^R/\tilde{B}^A$, dargestellt. Die bei den Zeitspuren von $R(\lambda, t)$ diskutierten charakteristischen Merkmale finden sich auch in den Spalten von \tilde{R} (Abb. 7.7c) wieder. Die Anisotropie des dritten Differenzspektrums ist über einen großen Wellenlängenbereich annähernd konstant. Im Vergleich zu diesem Wert sind die Anisotropiewerte des ersten Differenzspektrums im langwelligen Spektralbereich vom Betrag etwas kleiner. Die Anisotropie des zweiten Differenzspektrums verläuft im Bereich negativer Absorptionsdifferenz unterhalb und im Bereich positiver Absorptionsdifferenz oberhalb (in Abb. 7.7c nicht mehr im dargestellten Bereich) des dritten Anisotropiespektrums.

Die Verträglichkeit der Spalten von \tilde{B}^A mit den drei relevanten SVD-Basispektren, die sich aus dem zeitlich begrenzten Datenfeld $\Delta A(\lambda, t)$ ($200ns \leq t \leq 1.2ms$) ergaben, wurde überprüft. Dazu wurde die linke Seite der Gleichung $S - \tilde{B}^A C' = 0$ durch Variation der Einträge der Transformationsmatrix C' minimiert. Im Minimum betragen die Abweichungen weniger als 2 mOD.

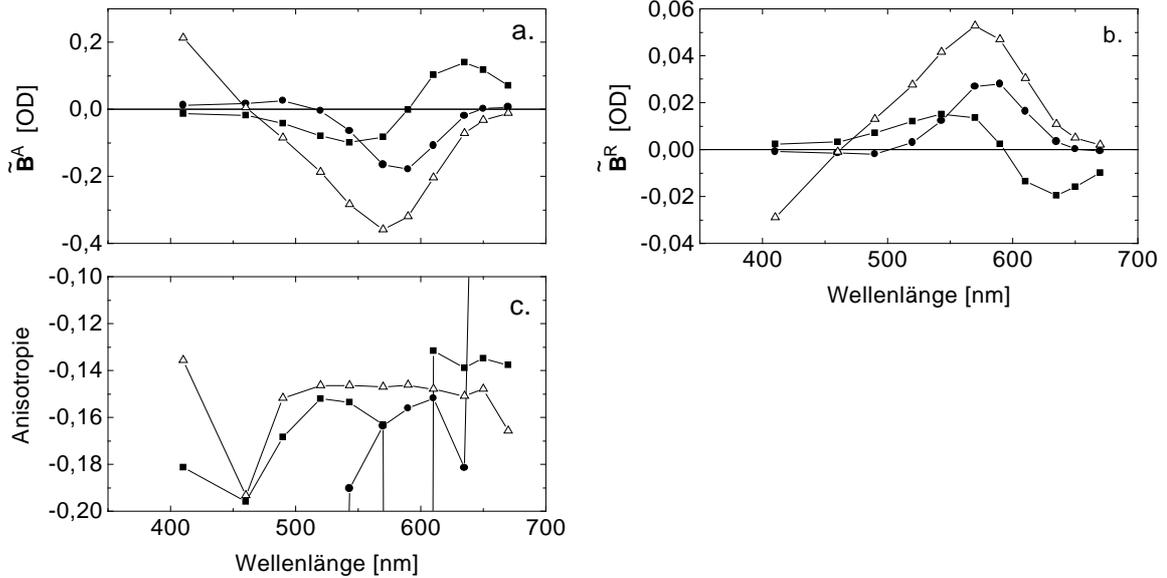


Abbildung 7.7: Asymptotische Differenzspektren: (a) $\tilde{\mathbf{B}}^A$, (b) $\tilde{\mathbf{B}}^R$. (c) Anisotropie $\tilde{\mathbf{R}} := \tilde{\mathbf{B}}^R/\tilde{\mathbf{B}}^A$. ■ : vor Relaxation 1, ● : vor Relaxation 2, △ : vor Relaxation 3.

Zur Berechnung der $\tilde{\mathbf{C}}$ -Matrix sind in den Matrizen $\tilde{\mathbf{B}}^A$ und $\tilde{\mathbf{B}}^R$ zunächst die Zeilen zu streichen, die den niedrigeren Wellenlängen ($\lambda < 500\text{nm}$) zugeordnet sind. Mit Gl.(4.43) ergibt sich dann die dritte Spalte der $\tilde{\mathbf{C}}^{-1}$ -Matrix:

$$(\tilde{\mathbf{C}}^{-1})_{13} = 0.13 \quad ; \quad (\tilde{\mathbf{C}}^{-1})_{23} = -0.67 \quad ; \quad (\tilde{\mathbf{C}}^{-1})_{33} = 2.92$$

Diese Spalte liefert mit Gl.(4.44) und Gl.(4.45) die wellenlängenabhängige bzw. die gewichtete mittlere Anisotropie des Grundzustandes ($\bar{r}_{bR} = -0.145 \pm 0.001$). Da die Zeitkonstanten der Relaxationen jeweils um mindestens eine Zehnerpotenz verschieden waren, ist es gerechtfertigt, mit Gl.(4.41) aus $(\tilde{\mathbf{C}}^{-1})_3$ den Anteil der angeregten Moleküle zu bestimmen. Es ergibt sich ein relativ hoher Wert von $\eta = 0.420$, der auf die isotope Anregung bei diesen Experimenten zurückzuführen ist. Ähnliche Werte wurden auch durch Doppelblitzexperimente [Dic98] ohne die Verwendung von asymptotischen Differenzspektren gefunden.

Durch η ist auch die erste Spalte von $\tilde{\mathbf{C}}^{-1}$ bestimmt und somit sind das Absorptionsspektrum (Gl.(4.32)), die wellenlängenabhängige Anisotropie (Gl.(4.34)) und die mittlere Anisotropie (Gl.(4.35)) des K-Intermediates zu berechnen. Wie die Betrachtung der Anisotropiezeitspuren andeutete, ist die mittlere K-Anisotropie $\bar{r}_K = -0.140 \pm 0.001$ vom Betrag etwas kleiner als die Grundzustandsanisotropie r_{bR} . Da $(\tilde{\mathbf{C}}^{-1})_{13} > 0$ und $(\tilde{\mathbf{C}}^{-1})_{23} < 0$, liefert Gl.(4.49) eine untere Grenze für den Beitrag des K-Intermediats in den zweiten Spalten von $\tilde{\mathbf{B}}^A$ bzw. $\tilde{\mathbf{B}}^R$: $x_2 \geq 0.082$. Mit dieser Relation und Gl.(4.41) als Nebenbedingungen und unter Verwendung der Parametrisierung Gl.(4.48) wurden die zweite Spalte von $\tilde{\mathbf{C}}^{-1}$ und die zugehörige Anisotropie durch Minimierung der linken Seite des Gleichungssystems Gl.(4.31) ermittelt: $x_2 = 0.082$, $x_3 = 0.0$, $y_2 = 0.338$, $y_3 = 0.077$, $z_2 = 0.0$, $z_3 = 0.343$, $r_L = -0.132$. Die Anisotropie des L-Intermediates r_L ist identisch mit gewichteten mittleren Anisotropie $\bar{r}_L = -0.132 \pm 0.002$.

Mit den Zeilen von $\tilde{\mathbf{B}}^A$ und $\tilde{\mathbf{B}}^R$, die den niedrigeren Wellenlängen ($\lambda < 500\text{nm}$) zugeordnet sind, ergeben sich aus $(\tilde{\mathbf{C}}^{-1})_3$ auch die Absorptionswerte (Gl.(4.32)), die wellenlängenabhängige Anisotropie (Gl.(4.34)) und die mittlere Anisotropie (Gl.(4.35)) des M-Intermediates. Wegen der wenigen Wellenlängenpunkte im Absorptionbereich von M ist jedoch nur der

Anisotropiewert im Absorptionsmaximum $r_M(410nm) = -0.139$ relevant, der Fehler wird auf ± 0.003 abgeschätzt. Die Daten des kurzwelligen Spektralbereichs wurden nicht in das Minimierungsverfahren einbezogen, da nicht unbedingt gesichert ist, daß die Anisotropien des bR-Grundzustand und des L-Intermediates in den höheren Absorptionsbanden identisch mit denen der Hauptabsorptionsbanden sind. Die Gleichlichtmessung (siehe Kap. 5.5, Abb. 5.13d) schien dies zwar für den Grundzustand zu bestätigen, doch der Anisotropiewert im Spektralbereich der höheren Bande war mit einem relativ großen Fehler behaftet. Für das L-Intermediat liegt dazu keine Information vor.

Die Absorptionsspektren und die Anisotropien der Intermediate und des Grundzustandes sind in Abb. 7.8 dargestellt. Die Streuung der wellenlängenabhängigen Anisotropien (Symbole in Abb. 7.8b) um die gewichteten Mittelwerte (horizontale Linien in Abb. 7.8b) ist verhältnismäßig gering und bestätigt damit den Auswertungsansatz und die einschränkenden Annahmen. Aus den mittleren Anisotropien der Intermediate und des Grundzustandes läßt sich der Polarwinkel des Übergangsdipolmomentes bezüglich der Membrannormalen in den Intermediaten berechnen. Unter der Annahme daß dieser Winkel im Grundzustand $\theta_{bR} = 70^\circ$ [Hey77, Lin89] beträgt, ergeben sich mit Gl.(2.29) in den Intermediaten die Winkel $\theta_K = 69.3 \pm 0.3^\circ$, $\theta_L = 68.3 \pm 0.3^\circ$ und $\theta_M = 69.2 \pm 0.5^\circ$.

Einen weiteren Beleg für die Gültigkeit des Ansatzes liefert der Vergleich der Zeitspuren (Abb. 7.8c), die mit der $\tilde{\mathbf{C}}$ -Matrix aus $\tilde{\mathbf{B}}^A$ und $\Delta\mathbf{A}$ (Gl.(4.39)) bzw. $\tilde{\mathbf{B}}^R$ und $\Delta\mathbf{A}R$ (Gl.(4.40)) berechnet wurden. Für alle Intermediate ergibt sich gute Übereinstimmung, und in beiden Fällen ist die Summe der Konzentrationen von K,L und M in einem Zeitbereich von $t = 200ns$ bis $t = 800\mu s$ nahe bei $\eta = 0.42$.

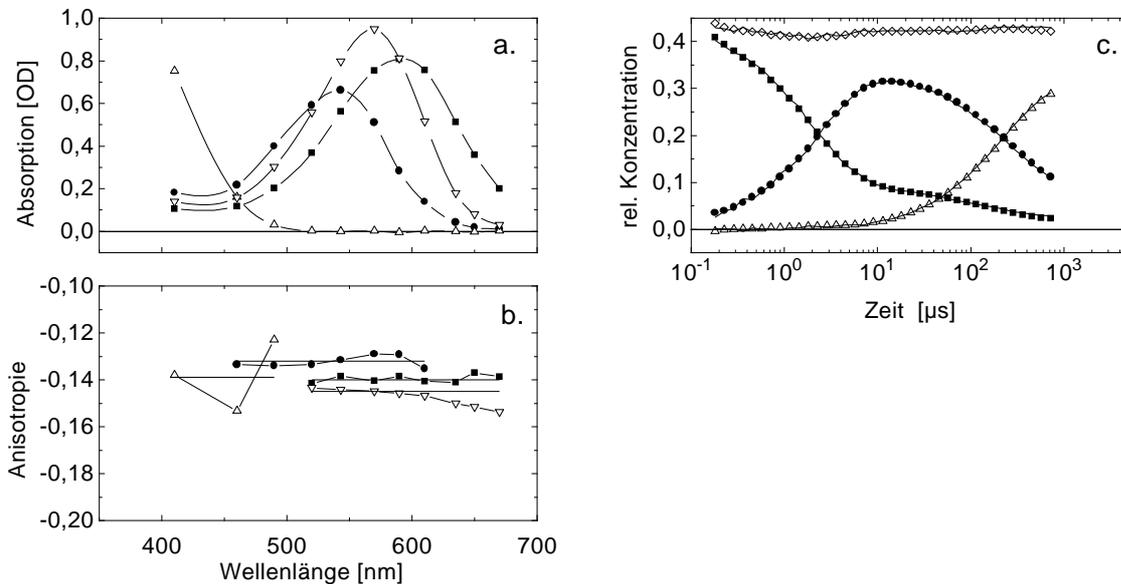


Abbildung 7.8: Ergebnis der Auswertung: (a) Intermediatsspektren \mathbf{A} , (b) Anisotropie der Intermediate, Symbole: $(r_i)_\lambda$, — : \bar{r}_i , (c) zeitlicher Verlauf der Intermediate, Symbole: Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)$ nach Gl.(4.39), — : Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ nach Gl.(4.40). ■ : K, ● : L, △ : M. ▽ : bR, ◇ in (c): Konzentrationssumme von K, L und M.

7.2 Experimente am nativen System: PM in anisotrop gequollenen Gelen

In Ergänzung der Experimente an magnetisch orientierten Proben wurden auch zeitaufgelöste Messungen an PM in anisotrop gequollenen Gelen durchgeführt. Da die anisotrop gequollenen Gele optisch weniger homogen sind und daher einen höheren Streuuntergrund aufweisen, sind diese Messungen sicherlich mit einem größeren Fehler behaftet. Der Einfluß der Spannungsdoppelbrechung bewirkt außerdem bei Polarisationswinkeln θ ungleich 0° oder 90° eine erhebliche Schwächung des Meßlichtes, was eine Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses nach sich zieht. Wegen dieser Nachteile wurden die Messungen bei lediglich fünf repräsentativen Wellenlängen ($410nm$, $490nm$, $543nm$, $570nm$ und $635nm$) durchgeführt. Ansonsten wurde ganz analog wie bei den Experimenten an magnetisch orientierten Proben (siehe Kap. 7.1) vorgegangen: Die polarisationsabhängige Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ wurde bei 14 Polarisationswinkeln aufgenommen, für jede Messung wurde über 30 Einzelblitze gemittelt, und schließlich wurde jede Zeitspur auf 10 Datenpunkte pro logarithmischer Dekade reduziert. Kontrollmessungen bei $570nm$ dienten zur Ermittlung der Korrekturfaktoren (siehe Kap. 6.2). Die Messungen erfolgten an einem Gel, das in einer Halbmikroküvette gequollen war und einen Ordnungsparameter S_2 von etwa -0.35 erreicht hatte.

Bei der Auswertung der Meßdaten ergab sich zunächst das Problem, daß die polarisationsabhängige Absorptionsänderung mit drei freien Parametern ($\Delta A(\lambda, t)$, $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und $\Delta\phi_E(\lambda, t)$) in der Modellfunktion Gl.(4.10) nicht angepaßt werden konnte. Für die Phasendifferenz $\Delta\phi_E(\lambda)$ als festen Parameter war dabei der aus der zugehörigen Gleichlichtmessung ermittelte Wert eingesetzt worden. Die Anpassung der polarisationsabhängigen Extinktion $E(\lambda, \theta)$ nach Gl.(4.6) zeigte aber sehr gute Übereinstimmung mit den Meßdaten (linke Spalte von Abb. 7.9). Dennoch stellte sich heraus, daß eine Anpassung der polarisationsabhängigen Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ nur möglich war, wenn eine Abweichung für $\Delta\phi_E(\lambda)$ bezüglich des aus der Gleichlichtmessung ermittelten Wertes zugelassen wurde. Dazu erfolgte eine Anpassung von $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit $\Delta\phi_E(\lambda)$ als zusätzlichem variablen Parameter, wobei ein Zeitpunkt gewählt wurde ($t = 1.8ms$), bei dem die Meßsignale ihren größten Wert annehmen. Die Anpassung mit $\Delta\phi_E(\lambda)$ und $\Delta\phi_E(\lambda, t)$ als freie unabhängige Parameter gelingt offenbar nur, wenn die Phasendifferenzen ausreichend groß sind ($\Delta\phi_E \geq 90^\circ$). Bei den magnetisch orientierten Proben ($\Delta\phi_E < 45^\circ$) war $\Delta\phi_E(\lambda)$ als fester Parameter für die Anpassung erforderlich, obwohl streng mathematisch in Gl.(4.10) keine Abhängigkeit zwischen $\Delta\phi_E(\lambda)$ und $\Delta\phi_E(\lambda, t)$ vorliegt.

In der rechten Spalte von Abb. 7.9 ist klar zu erkennen, daß die Anpassung mit $\Delta\phi_E(\lambda)$ als freiem Parameter (durchgezogene Linie) gute Übereinstimmung mit den Meßdaten liefert, während die Anpassung mit festem $\Delta\phi_E(\lambda)$, das aus der Gleichlichtmessung bestimmt worden war, beträchtliche Abweichungen zeigt (gestrichelte Linie). Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse für $\Delta\phi_E(\lambda)$ aus den beiden Anpassungen gegenüber, die angegebenen Fehler sind aus den Diagonalelementen der Varianz-Kovarianz-Matrix berechnet:

λ	$\Delta\phi_E(\lambda)$ aus $E(\lambda, \theta)$	$\Delta\phi_E(\lambda)$ aus $\Delta A(\lambda, \theta, 1.8ms)$
$410nm$	$180^\circ \pm 20^\circ$	$160.3^\circ \pm 0.3^\circ$
$490nm$	$138.2^\circ \pm 0.1^\circ$	$152.0^\circ \pm 0.5^\circ$
$543nm$	$119.5^\circ \pm 0.2^\circ$	$130.8^\circ \pm 0.4^\circ$
$570nm$	$108.9^\circ \pm 0.2^\circ$	$117.4^\circ \pm 0.6^\circ$
$635nm$	$87.4^\circ \pm 0.1^\circ$	$97.6^\circ \pm 0.9^\circ$

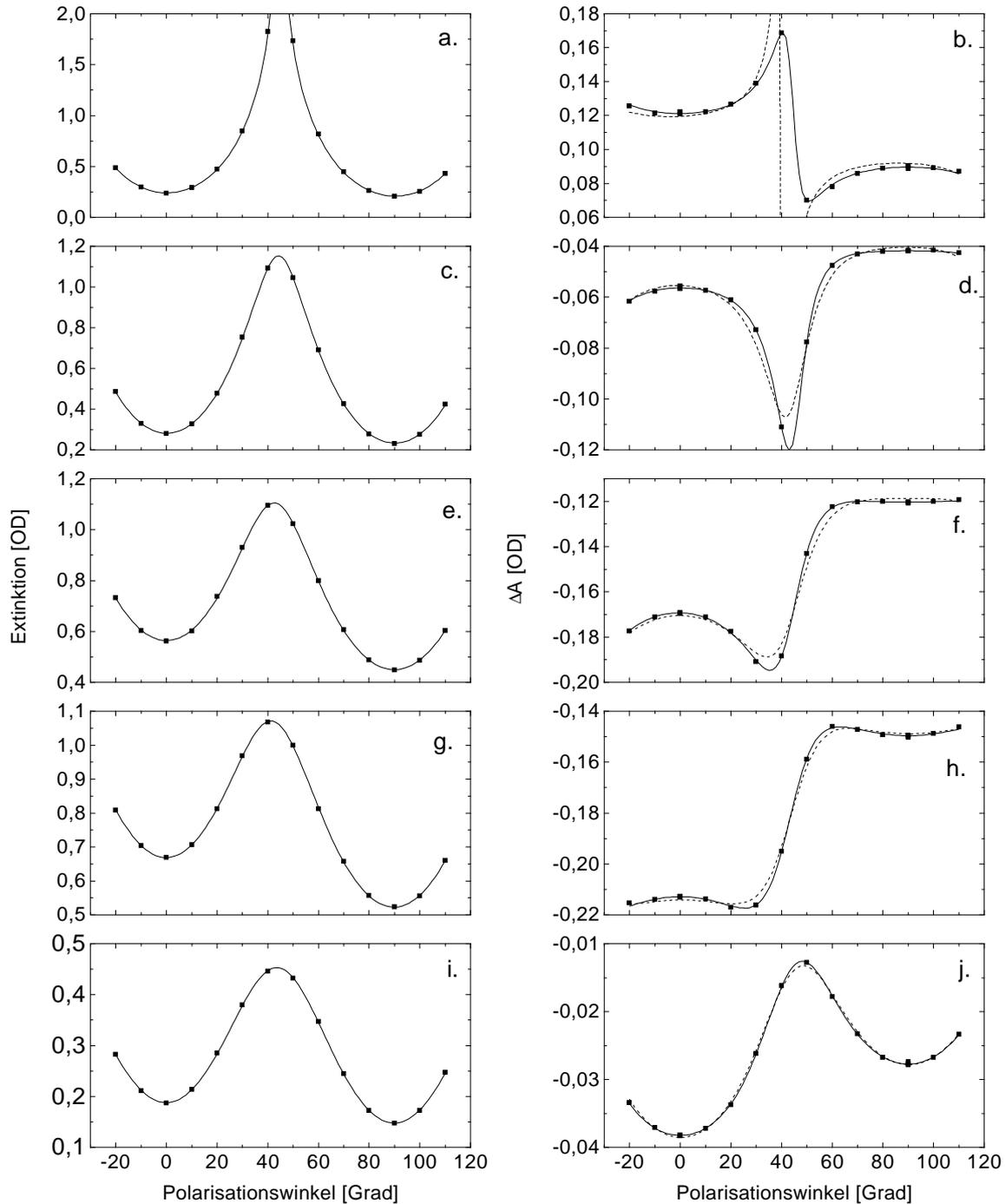


Abbildung 7.9: Polarisationsabhängige Extinktion $E(\lambda, \theta)$ (linke Spalte) und Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, 1.8ms)$ (rechte Spalte) einer anisotrop gequollenen PM-Probe, $S_2 \approx -0.35$, pH7, $T = 12^\circ\text{C}$. (a,b) $410nm$, (c,d) $490nm$, (e,f) $543nm$, (g,h) $570nm$, (i,j) $635nm$. Symbole: Datenpunkte, Linke Spalte — : Anpassung mit Gl.(4.6), Rechte Spalte — : Anpassung mit Gl.(4.10) mit $\Delta\phi_E$ als freiem Parameter, Rechte Spalte - - - : Anpassung mit Gl.(4.10) mit festem $\Delta\phi_E$ aus der Anpassung der Gleichlichtmessung.

Die Ursache dieser Abweichungen ist jedoch unklar. Möglicherweise wurde durch den Quellprozeß keine perfekte uniaxiale Symmetrie erreicht, die für die formale mathematische Beschreibung vorausgesetzt worden war. Die Behandlung der Lichtausbreitung in mehrachsigen Systemen ist wesentlich aufwendiger und soll hier nicht weiter betrachtet werden.

Der aus der Anpassung von $\Delta A(\lambda, \theta, 1.8ms)$ bestimmte Wert für $\Delta\phi_E(\lambda)$ wurde für Zeitpunkte von $t = 18\mu s$ bis $t = 180ms$ bestätigt, so daß die Anpassung des gesamten Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, 1.8ms)$ mit diesem Wert als festem Parameter erfolgen konnte. Das Ergebnis der Anpassung, $\Delta A(\lambda, t)$, $(\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t))$ und $\Delta\Delta n(\lambda, t)$, nach Korrektur gemäß Gln.(6.1,6.2,6.4), ist für alle fünf Wellenlängen in Abb. 7.10 gezeigt. Aus $\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ wurde die transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$ gebildet (Abb. 7.10c), die nun mit den entsprechenden Zeitspuren aus dem Experiment mit der magnetisch orientierten Probe verglichen werden kann.

Wegen des unterschiedlichen Vorzeichens des Ordnungsparameters S_2 verlaufen die Anisotropiezeitspuren konsequenterweise bei den beiden Experimenten mit entgegengesetztem Vorzeichen. Da die Orientierung der gequollenen Probe weniger gut war, sind die Beträge der Anisotropie entsprechend kleiner. Die charakteristischen Merkmale, die bei der magnetisch orientierten Probe festzustellen waren, finden sich auch bei der gequollenen Probe: (1) Im ms -Bereich erreicht die Anisotropie bei allen Wellenlängen, außer $\lambda = 410nm$, nahezu den gleichen Wert ($r_{bR} \approx 0.12$). Die $410nm$ -Anisotropiezeitspur nimmt im selben Zeitfenster etwas kleinere Werte an (≈ 0.11). (2) Ebenfalls kleinere Werte (≈ 0.10) sind bei $\lambda = 635nm$ im Zeitbereich von $200ns$ bis $2\mu s$ zu verzeichnen. (3) Bei $t \approx 10\mu s$ ergeben sich die Relationen

$$R(490nm, 10\mu s) \ll r_{bR} < R(570nm, 10\mu s) < R(543nm, 10\mu s)$$

Qualitativ zeigen die Anisotropiezeitspuren also eine gute Übereinstimmung mit dem Experiment an magnetisch orientierten PM.

Die Zeitspuren der transienten Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ sind erstaunlicherweise relativ glatt, wenn berücksichtigt wird, daß die Amplituden im transienten Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ nur etwa 40% bezüglich des Vergleichsexperiments an magnetisch orientierten PM betragen (vgl. Abb. 7.3b und Abb. 7.10b). Selbst im Zeitbereich $t < 1\mu s$ sind

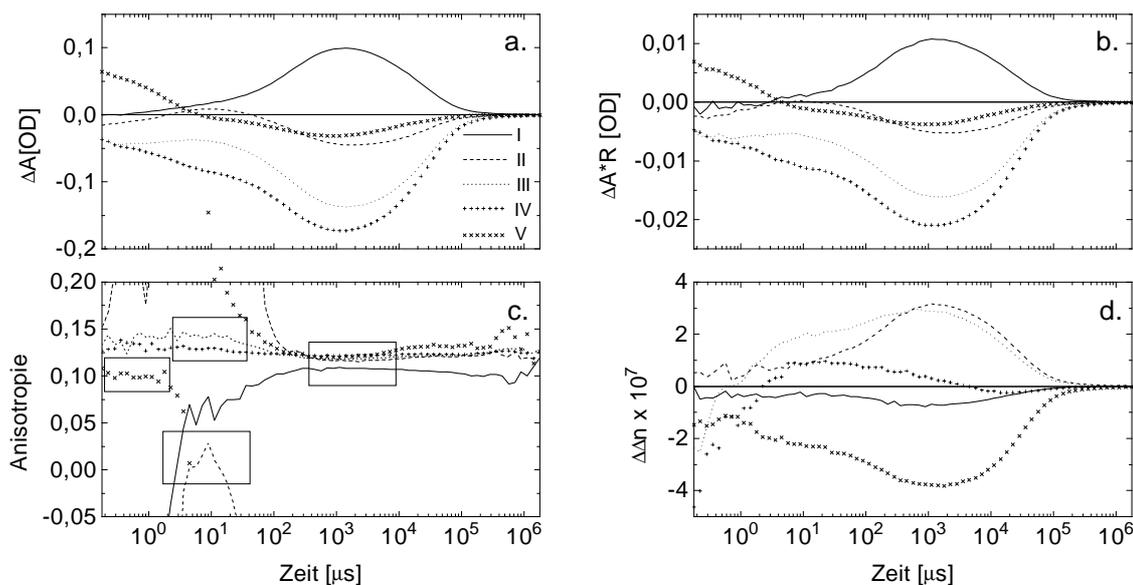


Abbildung 7.10: Ergebnis der Anpassung des Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Gl.(4.10) für die gemessenen Wellenlängen. I: $410nm$, II: $490nm$, III: $543nm$, IV: $570nm$, V: $635nm$. (a) (isotrope) Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, (b) transienter Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$, (c) transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$, (d) transiente Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$.

die Werte bei den gemessenen Wellenlängen mit dem Zerfall eines Intermediates (K) konsistent, das in der Absorption rotverschoben ist. Wegen der geringen Anzahl von Wellenlängen kann aber keine genaue Kontrolle durch die Kramers–Kronig–Relationen erfolgen. Es sei nur erwähnt, daß für $t \approx 10\mu\text{s}$ bzw. $t \approx 1\text{ms}$ im Rahmen von $\pm 10\%$ gute Übereinstimmung mit dem Vergleichsexperiment erzielt wurde.

7.3 Experimente am modifizierten System: Die Mutante D96A

7.3.1 Standardbedingungen: Neutraler pH–Wert und Zimmertemperatur

Unter Standardbedingungen ($\text{pH}7$, $T \approx 20^\circ\text{C}$) liegt der Zerfall des M–Intermediates bei der Mutante D96A im Sekundenbereich, so daß Meßzeiten von mindestens 10s erforderlich sind. Wegen der begrenzten Speichertiefe der Hardwarekomponenten zur Datenaufnahme sind deswegen die Abtastraten in beiden Aufnahmekanälen entsprechend (um etwa einen Faktor 10) zu reduzieren. Die schnellen Relaxationsprozesse, insbesondere der Zerfall des K–Intermediates, können gegenüber der Messung des nativen Systems folglich nur mit einer schlechteren Zeitaufösung erfolgen. Um die Gesamtdauer einer solchen Meßreihe auf ein vernünftiges Maß zu reduzieren, wurde die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ bei 12 Wellenlängen (390nm bis 650nm) und nur drei Polarisationswinkeln ($\theta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$) gemessen, wobei über jeweils 30 Einzelblitze gemittelt wurde. Zur genaueren Charakterisierung des L–Intermediates wurden zusätzliche Messungen für die drei Wellenlängen $\lambda = 460\text{nm}$, $\lambda = 490\text{nm}$ und $\lambda = 543\text{nm}$ bei acht Polarisationswinkeln ($\theta = -20^\circ, 0^\circ, 20^\circ, 40^\circ, 50^\circ, 70^\circ, 90^\circ, 110^\circ$) durchgeführt.

Nach der üblichen Reduktion auf 10 Datenpunkte pro logarithmische Dekade wurden aus dem Datenfeld $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Hilfe von Gl.(4.10) die Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$, $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ ermittelt. Bei nur drei Polarisationswinkeln ergeben sich diese drei Zeitspuren analytisch aus den gemessenen polarisationsabhängigen Absorptionsänderungen. Eine geringe Drift der Anregungsintensitäten wurde durch die Korrektur mit Gln.(6.1,6.2,6.4) ausgeglichen.

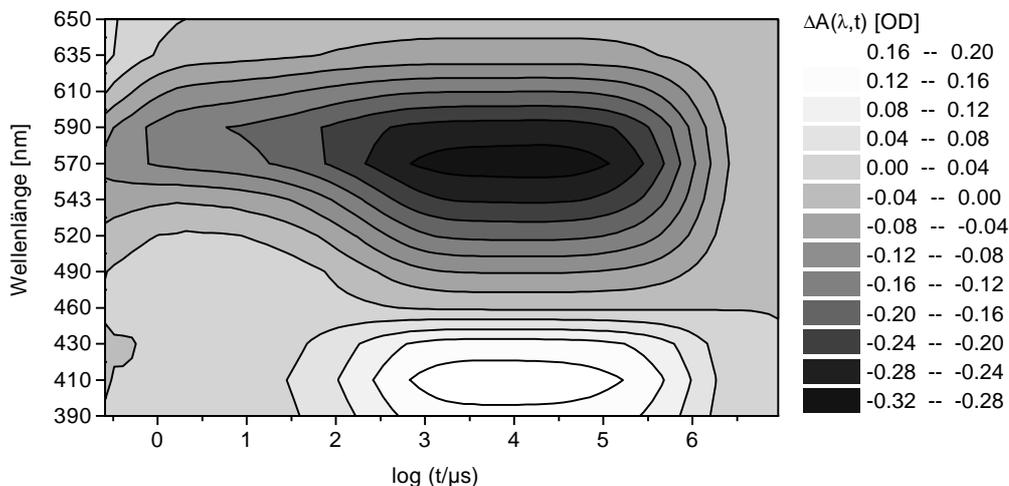


Abbildung 7.11: Höhenliniendarstellung der isotropen Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ einer magnetisch orientierten Probe, D96A, $S_2 \approx 0.47$, $\text{pH}7.0$, $T = 20^\circ\text{C}$. Die Wellenlängenskala ist nichtlinear.

chen. Die Höhenliniendarstellung der isotropen Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ in Abb. 7.11 verdeutlicht die typischen Merkmale des Photozyklus der Mutante D96A: Im mittleren Zeitbereich ($1\text{ms} < t < 100\text{ms}$) treten nur geringe Variationen in der Absorptionsänderung auf, die einen extrem langlebigen M-Zustand mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 410\text{nm}$ anzeigen. Im langwelligen Spektralbereich weisen die relativ kleinen Änderungen für die frühen Zeitpunkte ($t \leq 1\mu\text{s}$) auf einen schnellen Zerfall des K-Intermediates hin. Positive Absorptionsänderungen im μs -Zeitbereich bis zu einer Wellenlänge von $\lambda \leq 520\text{nm}$ sprechen für eine hohe Akkumulation des L-Intermediates. Folgeintermediate des M-Zustandes, etwa ein im langwelligen absorbierendes O-Intermediat, sind nicht festzustellen.

Durch die Betrachtung der Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$ für fünf ausgewählte Wellenlängen (Abb. 7.12a) lassen sich diese qualitativen Aussagen überprüfen und quantifizieren. Die aus $\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ (Abb. 7.12b) berechneten Anisotropiezeitspuren $R(\lambda, t)$ (Abb. 7.12c) geben dabei wichtige Zusatzinformationen. Alle dargestellten Anisotropiezeitspuren verlaufen für $t \geq 1\text{ms}$ bis in den Sekundenbereich, d.h. sogar über die Lebensdauer des M-Intermediates hinaus, auf konstanten Werten. Folgeintermediate mit bezüglich des Grundzustandes abweichenden Anisotropien sind folglich ausgeschlossen. Aus dem Vergleich der Anisotropiewerte bei 410nm bzw. 570nm ergibt sich eine betragsmäßig kleinere Anisotropie für das M-Intermediat, in guter Übereinstimmung mit den Messungen am nativen System (vgl. Abb. 7.3). Die hohe Akkumulation des L-Intermediates zeigt sich insbesondere in den Anisotropiezeitspuren bei 490nm und 543nm im Zeitfenster von $1\mu\text{s} \leq t \leq 10\mu\text{s}$, wobei wiederum mit den Messungen am nativen System zu vergleichen ist. Da sich die Extremalwerte gemäß folgender Relationen verhalten,

$$R_{wt}(490\text{nm}) > R_{D96A}(490\text{nm}) > \bar{r}_{bR} \quad \text{und} \quad \bar{r}_{bR} > R_{wt}(543\text{nm}) > R_{D96A}(543\text{nm})$$

kann eine höhere L-Akkumulation bei D96A gefolgert werden. Die Zeitspuren der transienten Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ (Abb. 7.12d) weisen für $t \geq 10\mu\text{s}$ die gleiche

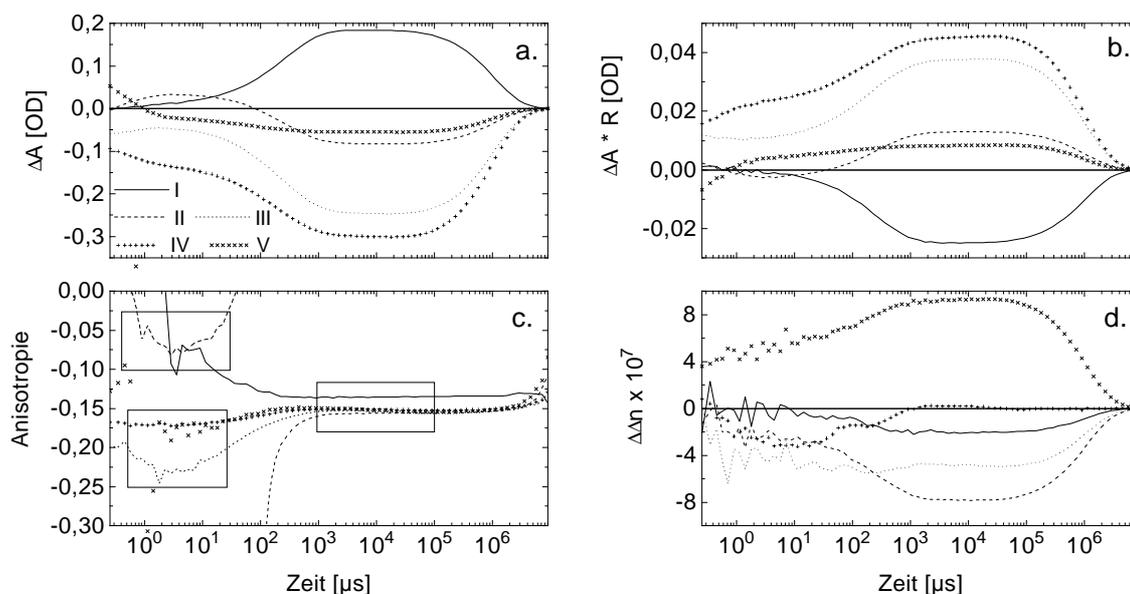


Abbildung 7.12: Ergebnis der Anpassung des Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Gl.(4.10) für fünf ausgewählte Wellenlängen. I: 410nm , II: 490nm , III: 543nm , IV: 570nm , V: 635nm . (a) (isotrope) Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, (b) transienter Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$, (c) transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$, (d) transiente Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$.

zeitliche Charakteristik auf wie $\Delta A(\lambda, t)$ bzw. $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$. Obwohl die transiente Doppelbrechungsänderung für alle Wellenlängen, außer für 460nm , 490nm und 543nm , aus nur drei Zeitspuren $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ hervorgegangen war, ergab sich ein relativ glatter zeitlicher Verlauf. Um die Aussagekraft der Absolutwerte zu testen, wurde wieder der Vergleich mit der Berechnung über die Kramers–Kronig–Relationen nach Gl.(4.14) für zwei diskrete Zeitpunkte herangezogen (Abb. 7.13). Für den frühen Zeitpunkt $t \approx 15\mu\text{s}$ wurde eine Mittelung über fünf logarithmische Datenpunkte durchgeführt. Die numerische Berechnung erfolgte, wie in Kap. 7.1 beschrieben, aus einem Splinefit an die Datenpunkte von $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$, wobei die Kurven für $\lambda = 690\text{nm}$ künstlich auf null gesetzt wurden. Die Übereinstimmung zwischen

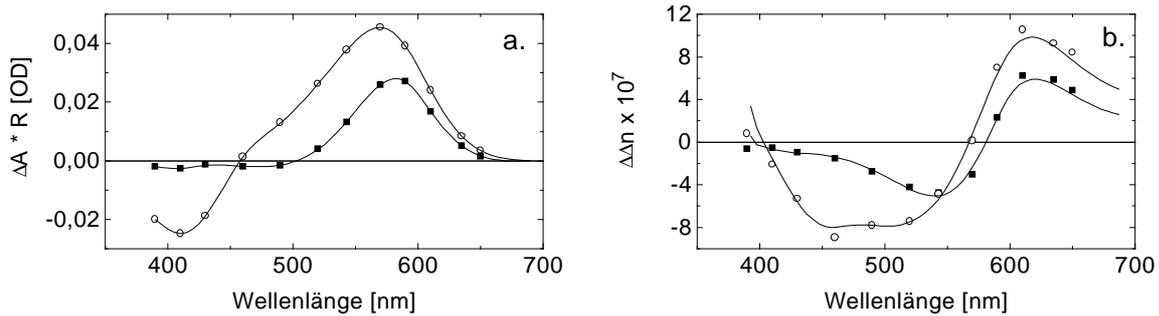


Abbildung 7.13: Spektrale Abhängigkeit (a) des Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und (b) der Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ für zwei diskrete Zeitpunkte, \blacksquare : $t \approx 15\mu\text{s}$ und \circ : $t = 14\text{ms}$. — in (a): Splinefits an die Datenpunkte, — in (b): Berechnung mit der Kramers–Kronig–Relation Gl.(4.14) aus den Splinefits von (a).

den Datenpunkten und den berechneten Kurven ist für beide Zeitpunkte überraschend gut. Durch die zusätzlichen Wellenlängenpunkte bei 390nm und 430nm steht die Berechnung hier auch für den kurzwelligen Spektralbereich auf einer besseren Grundlage im Vergleich zur Meßreihe am nativen System, wo auf diese Wellenlängen verzichtet worden war (siehe Abb. 7.4).

Für die weitere Datenanalyse wurde nun zunächst eine Singulärwertzerlegung des kombinierten Datenfeldes $(\Delta\mathbf{A}, \Delta\mathbf{A}\mathbf{R})^T$ durchgeführt. Dabei ergaben sich die folgenden Singulärwerte: $s = \{3.5973, 0.6403, 0.1523, 0.0144, 0.0106 \dots\}$. Da der vierte Singulärwert $s_4 = 0.0144$ weniger als 0.5% des ersten und weniger als 10% des dritten beträgt, werden nur die ersten drei als relevant betrachtet. Das Ergebnis der SVD ist in Abb. 7.14 dargestellt: Die drei relevanten Basisspektren $\mathbf{S} = \mathbf{U}^T\mathbf{D}(s)$ (Abb. 7.14a) bzw. $\mathbf{S}^R = (\mathbf{U}^R)^T\mathbf{D}(s)$ (Abb. 7.14b) und die zugehörigen Zeitspuren \mathbf{V} (Abb. 7.14c). Aus den Basisspektren und ihrem zeitlichen Verlauf läßt sich eine grobe Verknüpfung mit den Intermediaten ableiten. Im ersten Basisspektrum ist offenbar hauptsächlich der Grundzustand und das M–Intermediat enthalten, im zweiten Basisspektrum kommt das L–Intermediat hinzu, und im dritten überwiegt das K–Intermediat. Eine vollständige und physikalisch plausible Lösung auf der Grundlage der Basisspektren und der zugehörigen Zeitspuren (siehe Gl.(4.52)) konnte jedoch nicht ermittelt werden. Vermutlich ist das K–Intermediat wegen des schnellen Zerfalls unterrepräsentiert, so daß der Beitrag eines dritten linear unabhängigen Spektrums, dem eine nichtentartete Anisotropie zugeordnet ist, nicht zum Tragen kommt.

Daher wurde hier ebenfalls der Weg über die asymptotischen Differenzspektren eingeschlagen. Diese wurden nun aber aus einer Anpassung der Zeitspuren der Basisspektren konstruiert. Die globale Anpassung von nur drei Zeitspuren gelingt wesentlich leichter, da die Abweichungen überschaubar sind, und eine Abschätzung der Zeitkonstanten meist kein Problem

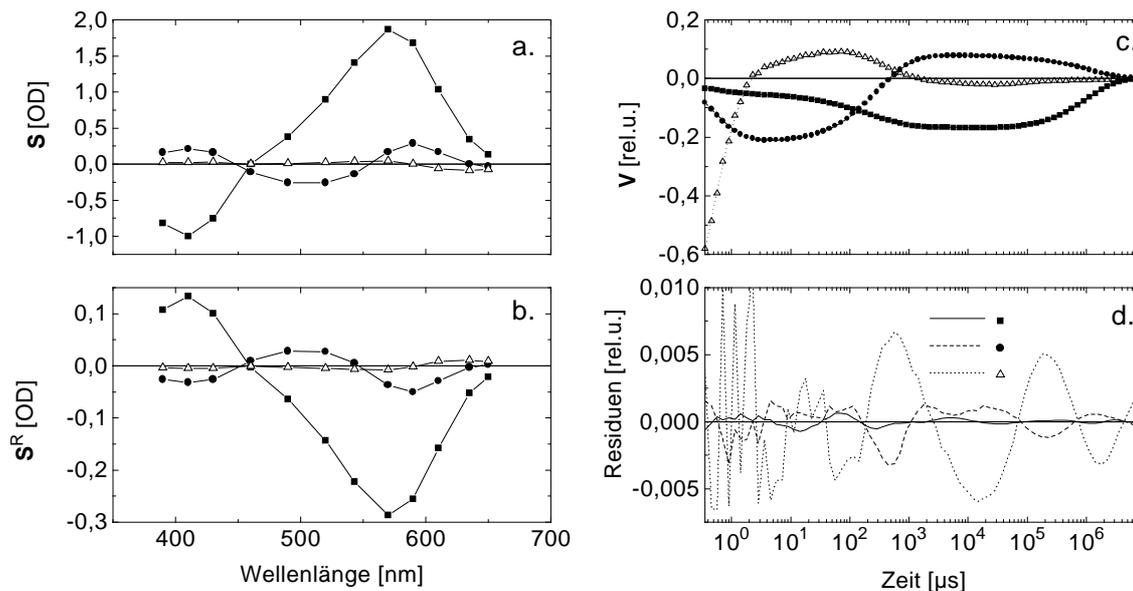


Abbildung 7.14: Ergebnis der SVD des Datenfeldes $(\Delta A, \Delta AR)^T$. (a) Basisspektren der isotropen Absorptionsänderung: $S = U^T D(s)$, (b) Basisspektren des transienten Lineardichroismus: $S^R = (U^R)^T D(s)$, (c) zugehörige Zeitspuren V , Symbole: Datenpunkte, Linien: Fitkurven. (d) Residuen aus der globalen Anpassung der Zeitspuren. Zuordnung der Komponenten in (a,b,c): \blacksquare : $s_1 = 3.5973$, \bullet : $s_2 = 0.6403$, \triangle : $s_3 = 0.1523$.

darstellt. Als Gewichte der Zeitspuren sind die jeweiligen Singulärwerte in der Anpassungsprozedur zu berücksichtigen. Verschiedene Versuche mit Kombinationen von Potenzgesetzen und Exponentialfunktionen zeigten, daß der vordere Teil des Photozyklus einschließlich des M-Aufbaus nicht mit zwei Potenzgesetzen anzupassen war, sondern eine zusätzliche Exponentialfunktion ($\tau_2 = 38\mu s$)¹, die zeitlich zwischen den Potenzgesetzen ($\tau_1 = 0.45\mu s$, $n_1 = 3.8$ und $\tau_3 = 280\mu s$, $n_3 = 2.9$) zu lokalisieren ist, erforderlich war. Der M-Zerfall ist mit drei Exponentialfunktionen ($\tau_4 = 27ms$, $\tau_5 = 800ms$ und $\tau_6 = 1.7s$) anzupassen. Die aus der Anpassung resultierenden Kurven sind in Abb. 7.14c über die Datenpunkte gelegt, die zugehörigen Abweichungen sind in Abb. 7.14d dargestellt. Entsprechend der Gewichtung mit den Singulärwerten sind die Abweichungen für die dritte Zeitspur am größten.

Die Amplitudenmatrix G aus der Anpassung der Zeitspuren V liefert über Gl.(4.59) nun die Matrizen der Amplitudenspektren B^A und B^R , die wiederum durch entsprechendes Spaltenaufsummieren die Matrizen der asymptotischen Differenzspektren erzeugen. Als linear unabhängige Differenzspektren wurden die erste Spalte (vor Relaxation 1), die zweite Spalte (vor Relaxation 2) und die vierte Spalte (vor Relaxation 4) ausgewählt und die restlichen Spalten gestrichen. Durch diese Wahl sind die Zeitkonstanten für das Entstehen und den Zerfall der Differenzspektren ausreichend getrennt², und die Nebenbedingung Gl.(4.41) kann als gültig betrachtet werden.

Die asymptotischen Differenzspektren, d.h. die Spalten der Matrizen \tilde{B}^A bzw. \tilde{B}^R , und die daraus resultierende Anisotropie $\tilde{R} := \tilde{B}^R / \tilde{B}^A$ sind in Abb. 7.15 dargestellt. Die spektrale Abhängigkeit ist wieder sehr ähnlich wie beim nativen System (vgl. Abb. 7.7). Die nahezu konstante Anisotropie des dritten Differenzspektrums (d.h. das Differenzspektrum vor Relaxation 4) für $\lambda \geq 490nm$ spricht für eine hohe Akkumulation des M-Intermediates, das

¹Die Indizierung der kinetischen Komponenten erfolgt nach der Größe der Zeitkonstanten

²Die Relaxationen 2 und 3 sind quasi zu einer zusammengefaßt.

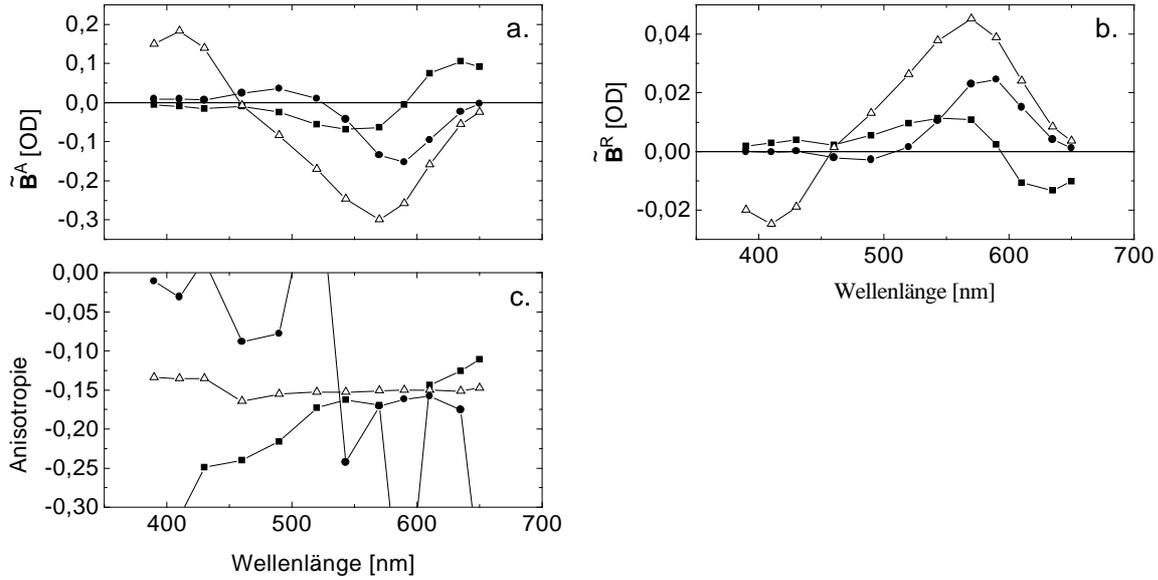


Abbildung 7.15: Asymptotische Differenzspektren: (a) \tilde{B}^A , (b) \tilde{B}^R . (c) Anisotropie $\tilde{R} := \tilde{B}^R/\tilde{B}^A$. ■ : vor Relaxation 1, ● : vor Relaxation 2, △ : vor Relaxation 4.

in diesem Spektralbereich, also offenbar auch für $\lambda = 490\text{nm}$, keinen Beitrag liefert. Dieser Anisotropiewert kann in guter Näherung als Grundzustandsanisotropie \bar{r}_{bR} betrachtet werden. Die drei Datenpunkte im kurzwelligen Spektralbereich haben ebenfalls fast identische Werte, jedoch einen kleineren Betrag, der in etwa die M–Anisotropie widerspiegelt. Das Anisotropieverhalten des zweiten Differenzspektrums entspricht der Überlagerung eines Intermediates (L), dessen Anisotropie vom Betrag kleiner als die des Grundzustandes ist. Deswegen liegen die Werte für $460\text{nm} \leq \lambda \leq 520\text{nm}$ oberhalb von \bar{r}_{bR} und für $\lambda \geq 543\text{nm}$ unterhalb von \bar{r}_{bR} , entsprechend dem Vorzeichen des Differenzspektrums $(\tilde{B}^A)_2$. Die Anisotropiewerte des ersten Differenzspektrums im langwelligen Spektralbereich streuen sehr stark, was auf die Mängel des Extrapolationsverfahrens hinweist, wenn der K–Zerfall im Rahmen der zeitlichen Auflösung zu schnell erfolgt. Für $490\text{nm} \leq \lambda \leq 570\text{nm}$ ist das Verhalten aber qualitativ im Einklang mit einer K–Anisotropie, die ebenfalls etwas kleiner als \bar{r}_{bR} ist. Aus den asymptotischen Differenzspektren \tilde{B}^A und \tilde{B}^R des Wellenlängenbereichs³ $\lambda \geq 490\text{nm}$ wurden durch Minimierung der linken Seite von Gl.(4.30) alle Koeffizienten der \tilde{C} –Matrix und die Anisotropien r_K , r_L und r_{bR} simultan bestimmt. Dazu wurde die parametrisierte Form von der \tilde{C}^{-1} –Matrix (Gl.(4.47)) verwendet und als Nebenbedingungen Gl.(4.41) und Gl.(4.42) angesetzt. Das Ergebnis der Minimierungsprozedur für \tilde{C} lautet:

$$\tilde{C} = \begin{pmatrix} 0.383 & 0.045 & 0.026 \\ 0 & 0.336 & 0.042 \\ 0 & 0.002 & 0.315 \end{pmatrix}$$

Die Anregungseffizienz $\eta = 0.383$, die aber immer von den jeweiligen experimentellen Anreizbedingungen abhängt, also nicht als systemspezifische Größe zu verstehen ist, war demnach um knapp 10% kleiner als beim Experiment am nativen System. Für die Anisotropien

³Bei der Mutante D96A ist es aufgrund des photostationären M–Spektrums (siehe Abb. 5.13b) gerechtfertigt, auch für die Wellenlänge $\lambda = 490\text{nm}$ keinen Absorptionsbeitrag des M–Intermediates zuzulassen, d.h. $A_M(490\text{nm}) \equiv 0$. Die Anisotropie des dritten asymptotischen Differenzspektrums (siehe Abb. 7.15) deutet ebenfalls darauf hin, daß das M–Intermediat bei $\lambda = 490\text{nm}$ keine Beitrag zur Absorption liefert.

ergab sich $r_K = -0.142$, $r_L = -0.133$ und $r_{bR} = -0.149$. Aus den Spalten der Matrix $\tilde{\mathbf{C}}^{-1}$ berechnen sich nach Gl.(4.32) die Intermediatspektren $(\mathbf{A})_i$ und nach Gl.(4.34) die Anisotropien der Intermediate als wellenlängenabhängige Größen, wobei die Streuung um die Anisotropiemittelwerte eine Fehlerabschätzung liefert: $\bar{r}_K = -0.142 \pm 0.005$, $\bar{r}_L = -0.133 \pm 0.001$ und $\bar{r}_{bR} = -0.149 \pm 0.001$. Für das M-Intermediat ergibt sich nach Gl.(4.35) als mittlere Anisotropie $\bar{r}_M = -0.139 \pm 0.001$.

Die zeitlichen Verläufe der Intermediate sind nach Gl.(4.39) bzw. Gl.(4.40) zu erhalten, wobei wegen der fehlenden Folgeintermediate von M der ganze gemessene Zeitbereich betrachtet werden kann. Die Ergebnisse sind in Abb. 7.16 dargestellt. Die Intermediatspektren (Abb. 7.16a) sind den Spektren, die aus dem Experiment am nativen System bestimmt wurden (vgl. Abb. 7.8a), sehr ähnlich. Die zugehörigen Anisotropien (Abb. 7.16b) für K, L und M sind vom Betrag zwar nahezu gleich wie beim Wildtyp (vgl. Abb. 7.8b), die Werte müssen aber auf einen im Betrag etwas größeren Grundzustandswert ($r_{bR} = -0.149$ bei D96A, gegenüber $r_{bR} = -0.145$ bei Wildtyp) bezogen werden. Die aus den Anisotropien mit Gl.(2.29) berechneten Polarwinkel des Übergangsdipolmoments sind demnach geringfügig kleiner, wenn für den Grundzustand der gleiche Winkel ($\theta_{bR} = 70^\circ$) angenommen wird: $\theta_K = 69.1 \pm 0.7^\circ$, $\theta_L = 68.0 \pm 0.2^\circ$ und $\theta_M = 68.7 \pm 0.2^\circ$. Der Wert für das M-Intermediat stimmt gut mit dem Ergebnis aus der photostationären Messung (vgl. Kap. 5.5, $\theta_M = 68.6 \pm 0.3^\circ$) überein. Das Spektrum des photostationären M-Zustandes ist jedoch um etwa 10% in der Absorption kleiner als das aus der transienten Messung resultierende.

Die zeitlichen Verläufe (Abb. 7.16c) sind deutlich von denen beim Wildtyp verschieden (vgl. Abb. 7.8c). Der wesentlich schnellere K-Zerfall – nach $2\mu\text{s}$ beträgt die relative Konzentration nur noch 0.05 – ist nicht allein durch die um 10K höhere Temperatur zu erklären. Das L-Intermediat wird dadurch stärker akkumuliert. Die Modifikation (D96A) ist im zytoplasmatischen Kanal lokalisiert, der eigentlich nur bei der Reprotonierung der SB, also im M-Zerfall, involviert ist. Insofern ist ein Einfluß auf die Kinetik der frühen Photozyklusin-

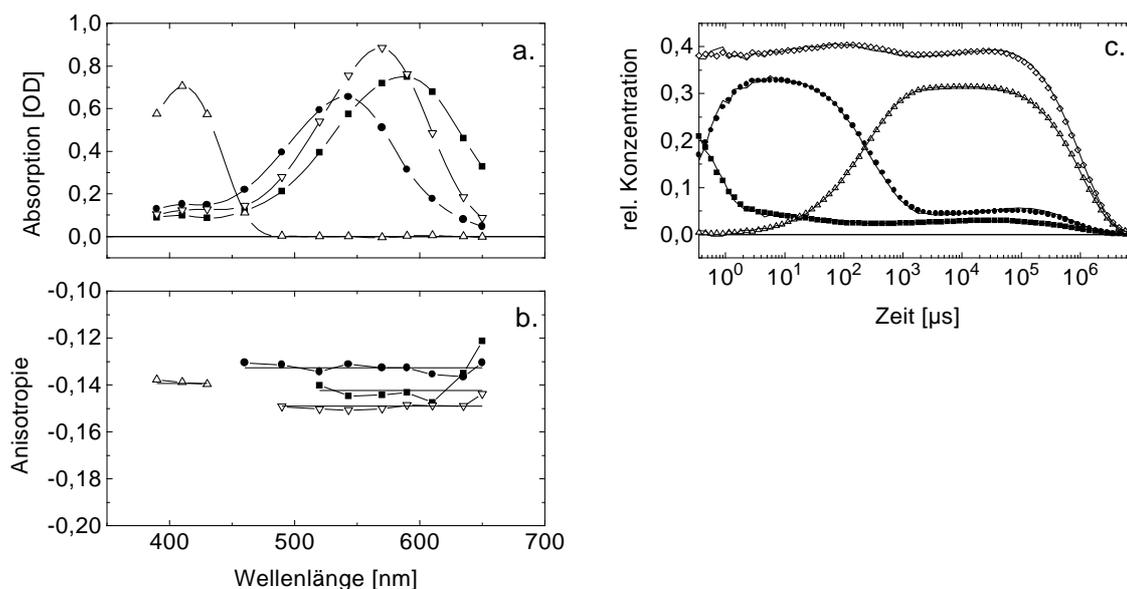


Abbildung 7.16: Ergebnis der Auswertung: (a) Intermediatspektren \mathbf{A} , (b) Anisotropie der Intermediate, Symbole: $(r_i)_\lambda$, — : \bar{r}_i , (c) zeitlicher Verlauf der Intermediate, Symbole: Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)$ nach Gl.(4.39), — : Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ nach Gl.(4.40). ■ : K, ● : L, △ : M. ▽ : bR, ◇ in (c): Konzentrationssumme von K, L und M.

termediate nicht unbedingt plausibel. Die über fast 4 Dekaden konstante Restkonzentration des K-Intermediates von 2–3% ist vermutlich ein Artefakt durch die fehlende Information im frühen Zeitbereich, wodurch das erste asymptotische Differenzspektrum nur relativ ungenau zu bestimmen ist.

7.3.2 Effekte im schwach sauren Milieu bei Zimmertemperatur

Gegenüber neutralem pH-Wert ist der M-Zerfall der Mutante D96A im sauren Milieu erheblich schneller. Bei pH4.7 und bei Zimmertemperatur ($T = 20^\circ\text{C}$) liegt die größte Zeitkonstante im Photozyklus von D96A bei etwa 100ms , so daß Meßzeiten von 1s ausreichend sind, und die optimale Zeitaufösung der Apparatur ausgenützt werden kann. Da eine Einzelmessung entsprechend kurz war, konnte ein Datenfeld $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ für 13 Wellenlängen (390nm bis 670nm) und acht Polarisationswinkel ($\theta = -20^\circ, 0^\circ, 20^\circ, 40^\circ, 50^\circ, 70^\circ, 90^\circ, 110^\circ$) aufgenommen werden, gemittelt über jeweils 30 Einzelblitze. Die Anpassung des auf 10 Datenpunkte pro logarithmischer Dekade reduzierten Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Gl.(4.10) lieferte die Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$, $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und $\Delta\Delta n(\lambda, t)$, die zusammen mit $R(\lambda, t)$ für die fünf ausgewählten Wellenlängen in Abb. 7.17 dargestellt sind. Wie bei allen anderen Meßreihen war eine Korrektur nach Gln. (6.1,6.2,6.4) erfolgt, um die Kurven bei verschiedenen Wellenlängen auf gleiche Anregungsintensität zu normieren.

Einige qualitative Aussagen lassen sich aus dem Vergleich mit der Messung bei pH7 (vgl. Abb. 7.12) ableiten. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Anregungseffizienz der Meßreihe bei pH4.7 um etwa 12% größer war als in der Meßreihe bei pH7. Diese Abschätzung ergab sich aus einem direkten Vergleich der Absorptionsänderungen beider Proben (Daten nicht gezeigt). Während die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ im vorderen Teil des Photozyklus ($t \leq 500\mu\text{s}$) kinetisch kaum Unterschiede zeigt, ist der M-Zerfall bei pH4.7 um etwa einen Faktor 10 schneller als bei pH7. Trotz höherer Anregungseffi-

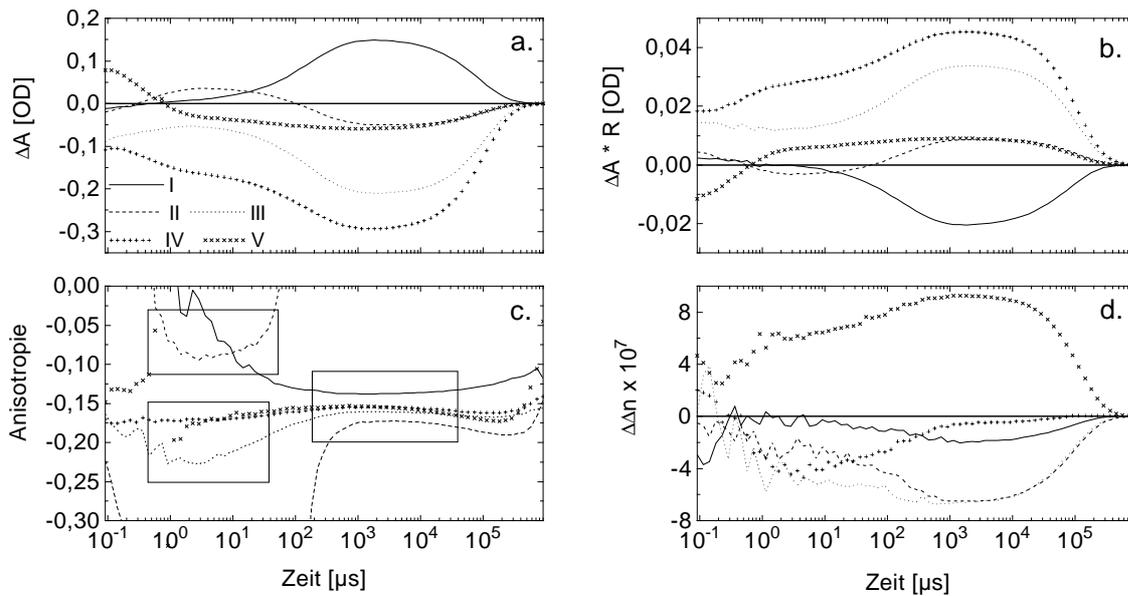


Abbildung 7.17: Ergebnis der Anpassung des Datenfeldes $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ mit Gl.(4.10) für fünf ausgewählte Wellenlängen. I: 410nm , II: 490nm , III: 543nm , IV: 570nm , V: 635nm . (a) (iso-trope) Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, (b) transienter Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$, (c) transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$, (d) transiente Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$.

zienz ist die maximale Absorptionsänderung bei $\lambda = 570\text{nm}$ in der Meßreihe bei pH4.7 sogar noch etwas kleiner ($\Delta A(570\text{nm}, 2\text{ms}) = -0.293\text{OD}$) als in der Meßreihe bei pH7 ($\Delta A(570\text{nm}, 10\text{ms}) = -0.300\text{OD}$). Das Verhältnis der maximalen Absorptionsänderung $\Delta A(410\text{nm})/\Delta A(570\text{nm})$ beträgt bei pH7 ca. 0.61, gegenüber 0.51 bei pH4.7. Diese Befunde deuten darauf hin, daß der M-Zustand im sauren Milieu deutlich schwächer akkumuliert wird und kinetisch von einem anderen Intermediat überlagert ist, das spektral nur wenig gegenüber dem Grundzustand verschoben ist. Der zeitliche Verlauf der Anisotropien (Abb. 7.17c) stützt eine solche Erklärung, da für $t \geq 1\text{ms}$ kein konstantes Verhalten wie bei pH7 (vgl. Abb. 7.12c) festzustellen ist. Die Anisotropiekurve bei 490nm – hier ist der relative Beitrag des überlagerten Intermediates offenbar am größten – ist außerdem deutlich von den anderen Kurven (543nm , 570nm und 635nm) abgesetzt.

Die transienten Doppelbrechungsänderungen (Abb. 7.17d) zeigen ebenfalls, gegenüber den Messungen bei pH7, signifikante Unterschiede. Die Zeitspuren bei 490nm und 543nm verlaufen für $t \geq 1\text{ms}$ fast deckungsgleich. Der Vergleich der Meßdaten mit der Berechnung aus dem transienten Lineardichroismus über die Kramers–Kronig–Relationen nach Gl.(4.14) liefert sehr gute Übereinstimmung. Abb. 7.18 zeigt die Spektren des Lineardichroismus

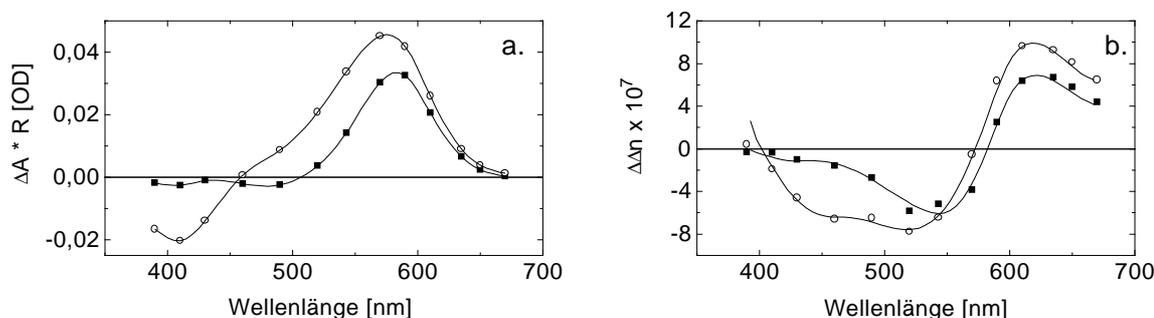


Abbildung 7.18: Spektrale Abhängigkeit (a) des Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und (b) der Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ für zwei diskrete Zeitpunkte, ■ : $t \approx 14\mu\text{s}$ und ○ : $t = 2.3\text{ms}$. — in (a): Splinefits an die Datenpunkte, — in (b): Berechnung mit der Kramers–Kronig–Relation Gl.(4.14) aus den Splinefits von (a).

$\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ und der Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(\lambda, t)$ für die beiden Zeitpunkte $t = 14\mu\text{s}$ und $t = 2.3\text{ms}$. Die relativ geringen Abweichungen besonders im langwelligem Spektralbereich (Abb. 7.18b) sprechen für die hohe Genauigkeit der Meßmethode, wenn Daten bei den oben angegebenen Polarisationswinkeln zur Verfügung stehen.

Eine Singulärwertzerlegung des kombinierten Datenfeldes $(\Delta\mathbf{A}, \Delta\mathbf{AR})^T$ ergab die folgenden Singulärwerte: $s = \{3.5073, 0.5935, 0.2886, 0.0307, 0.0089 \dots\}$. Der vierte Singulärwert $s_4 = 0.0307$ beträgt nun bei dieser SVD fast 1% des ersten und ist noch deutlich größer als der fünfte. Daher wurde der vierte Singulärwert für die weitere Auswertung mitberücksichtigt. Die SVD liefert neben den Singulärwerten die vier relevanten Basisspektren $\mathbf{S} = \mathbf{U}^T \mathbf{D}(s)$ (Abb. 7.19a) bzw. $\mathbf{S}^R = (\mathbf{U}^R)^T \mathbf{D}(s)$ (Abb. 7.19b) und die zugehörigen Zeitspuren \mathbf{V} (Abb. 7.19c). Aus den Zeitspuren ist zu erkennen, daß der vierte Singulärwert im vorderen Zeitbereich $t \leq 100\mu\text{s}$ nur einen verschwindenden Beitrag liefert, aber beim Entstehen und beim Zerfall des M-Intermediates involviert ist. Der nichtmonotone Verlauf der Zeitspuren des dritten und vierten Singulärwertes im Zeitbereich des M-Zerfalls deutet möglicherweise auf ein Nachfolgeintermediat hin, das vor Erreichen des Grundzustandes transient besetzt wird.

Die globale Anpassung der vier Zeitspuren erfolgte mit derselben Modellfunktion wie bei den

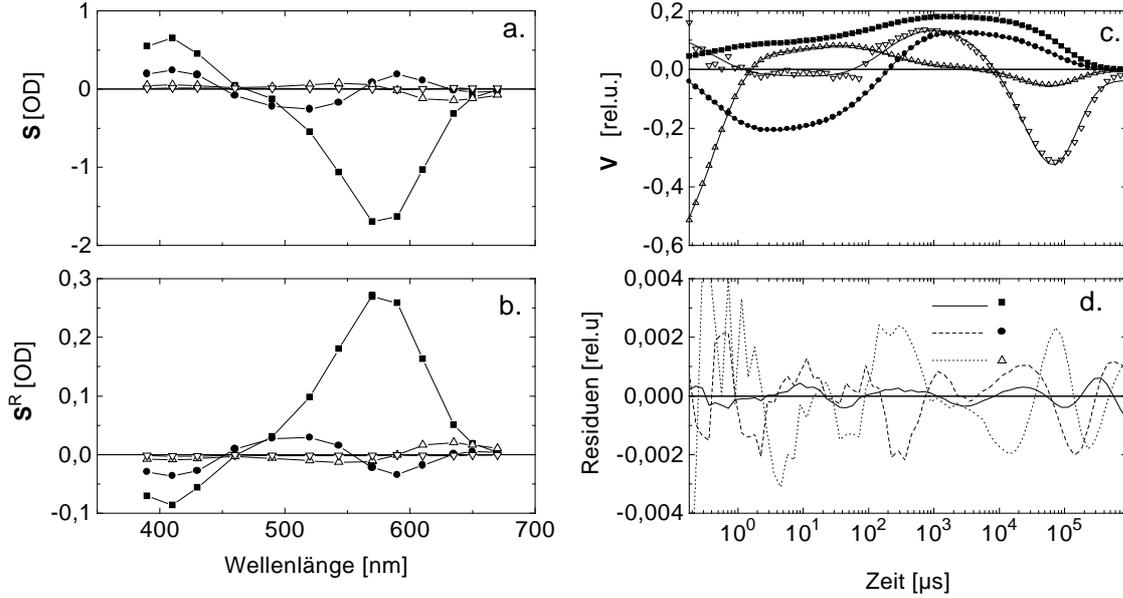


Abbildung 7.19: Ergebnis der SVD des Datenfeldes $(\Delta A, \Delta AR)^T$. (a) Basisspektren der isotropen Absorptionsänderung: $S = U^T D(s)$, (b) Basisspektren des transienten Lineardichroismus: $S^R = (U^R)^T D(s)$, (c) zugehörige Zeitspuren V , Symbole: Datenpunkte, Linien: Fitkurven. (d) Residuen der Komponenten s_1, s_2 und s_3 aus der globalen Anpassung der Zeitspuren. Zuordnung der Komponenten in (a,b,c): \blacksquare : $s_1 = 3.5073$, \bullet : $s_2 = 0.5935$, \triangle : $s_3 = 0.2886$, ∇ : $s_4 = 0.0307$.

Daten neutralen pH-Wertes, für den M–Aufbau zwei Potenzgesetze ($\tau_1 = 0.42\mu s$, $n_1 = 3.9$ und $\tau_3 = 180\mu s$, $n_3 = 2.7$) und eine Exponentialfunktion ($\tau_2 = 22\mu s$), für den M–Zerfall war jedoch eine Exponentialfunktion weniger erforderlich ($\tau_4 = 33ms$ und $\tau_5 = 100ms$). Die Fitkurven sind in Abb. 7.19c zusammen mit den Datenpunkten gezeigt, die zugehörigen Abweichungen der Komponenten s_1, s_2 und s_3 in Abb. 7.19d. Wegen des geringen Gewichts sind die Abweichungen für die vierte Zeitspur um ein Vielfaches größer, so daß der gewählte Bereich in Abb. 7.19d zur Darstellung nicht ausreichend wäre.

Ganz analog wie bei der Auswertung der Daten neutralen pH-Wertes (vgl. Kap. 7.3.1) wurden die asymptotischen Differenzspektren, d.h. die Spalten von \tilde{B}^A (Abb. 7.20a) bzw. \tilde{B}^R (Abb. 7.20b), konstruiert und daraus die Anisotropie \tilde{R} berechnet (Abb. 7.20c). Das erste und das zweite Differenzspektrum, sowie deren Anisotropieverläufe, weisen die gleiche Charakteristik auf wie die entsprechenden Spektren bei neutralem pH-Wert (vgl. Abb. 7.15). Das dritte Differenzspektrum und dessen Anisotropie zeigen aber auffällige Unterschiede, die schon bei den Zeitspuren $\Delta A(\lambda, t)$ und $R(\lambda, t)$ (siehe Abb. 7.17) hervortraten und in diesem Zusammenhang diskutiert wurden. Die „Krümmung“ der Anisotropiekurve im Wellenlängenbereich $490nm \leq \lambda \leq 670nm$ – der Datenpunkt bei $460nm$ liegt schon außerhalb des dargestellten Bereiches – zeigt die Überlagerung mit einem Intermediat (L), dessen Anisotropie im Betrag kleiner ist, als die des Grundzustandes.

Durch Minimierung der linken Seite von Gl.(4.30) für den Wellenlängenbereich $\lambda \geq 490nm$ wurden aus den asymptotischen Differenzspektren \tilde{B}^A und \tilde{B}^R die Einträge der Matrix \tilde{C} und die Anisotropien r_K, r_L und r_{bR} bestimmt, wobei die Nebenbedingungen Gl.(4.41) und Gl.(4.42) verwendet wurden. Die Minimierungsprozedur führte für \tilde{C} zu folgendem Ergebnis:

$$\tilde{C} = \begin{pmatrix} 0.447 & 0.029 & 0.013 \\ 0 & 0.407 & 0.184 \\ 0 & 0.011 & 0.250 \end{pmatrix}$$

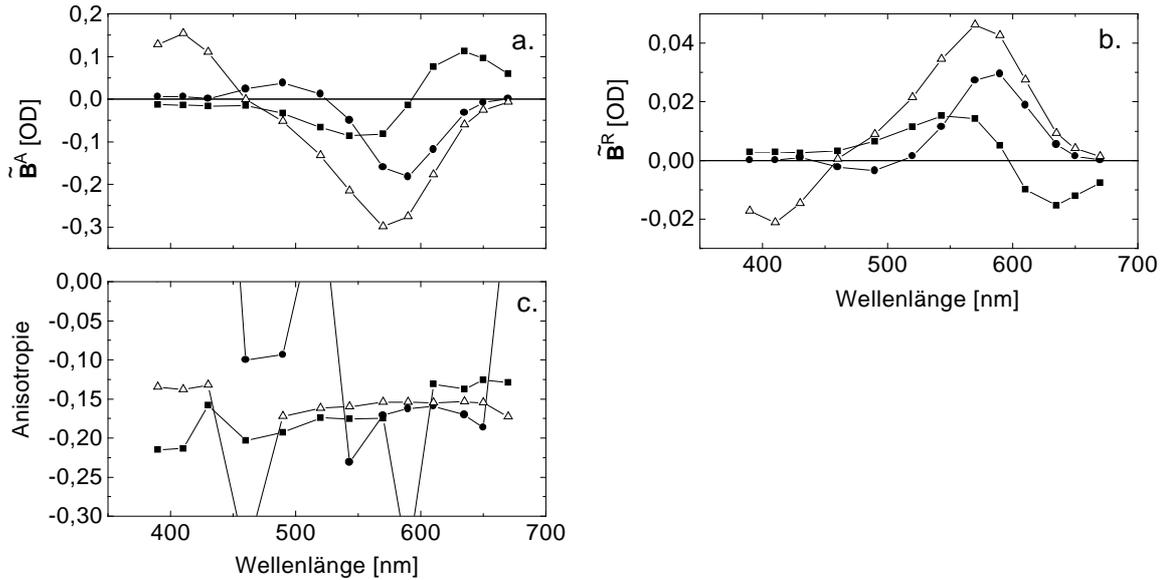


Abbildung 7.20: Asymptotische Differenzspektren: (a) \tilde{B}^A , (b) \tilde{B}^R . (c) Anisotropie $\tilde{R} := \tilde{B}^R/\tilde{B}^A$. \blacksquare : vor Relaxation 1, \bullet : vor Relaxation 2, Δ : vor Relaxation 4.

Die daraus resultierende Anregungseffizienz $\eta = 0.447$ war also um fast 17% größer als beim Experiment bei neutralem pH-Wert. Das Matrixelement $(\tilde{C})_{23} = 0.184$ gibt wie erwartet den relativ hohen Beitrag des L-Intermediates zum dritten asymptotischen Differenzspektrum an. Für die Anisotropien ergab sich $r_K = -0.143$, $r_L = -0.136$ und $r_{bR} = -0.150$ aus dem Minimierungsverfahren, in Übereinstimmung mit den gewichteten Mittelwerten $\bar{r}_K = -0.143 \pm 0.003$, $\bar{r}_L = -0.136 \pm 0.002$ und $\bar{r}_{bR} = -0.150 \pm 0.001$. Die mittlere Anisotropie des M-Intermediates $\bar{r}_M = -0.141 \pm 0.001$ wurde nach Gl.(4.35) bestimmt. Von

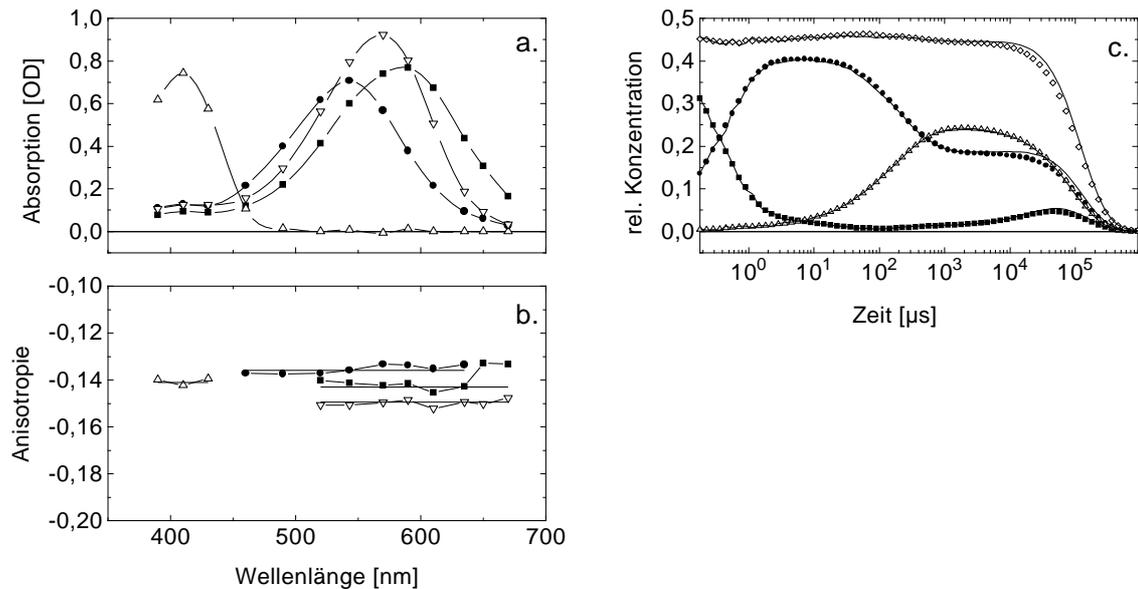


Abbildung 7.21: Ergebnis der Auswertung: (a) Intermediatsspektren A , (b) Anisotropie der Intermediate, Symbole: $(r_i)_\lambda$, — : \bar{r}_i , (c) zeitlicher Verlauf der Intermediate, Symbole: Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)$ nach Gl.(4.39), — : Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ nach Gl.(4.40). \blacksquare : K, \bullet : L, Δ : M. ∇ : bR, \diamond in (c): Konzentrationssumme von K, L und M.

den geringen Abweichungen für L und M abgesehen sind diese Werte konsistent mit dem Ergebnis bei neutralem pH-Wert und ergeben mit Gl.(2.29) die Polarwinkel des Übergangsdipolmomentes $\theta_K = 69.1 \pm 0.5^\circ$, $\theta_L = 68.3 \pm 0.3^\circ$ und $\theta_M = 68.9 \pm 0.2^\circ$.

Die aus \tilde{C} resultierenden Ergebnisse, die Intermediatsspektren, die wellenlängenabhängigen Anisotropien und die zeitlichen Verläufe der Intermediate, sind in Abb. 7.21 dargestellt. Die Intermediatsspektren stimmen im wesentlichen mit denen bei neutralem pH-Wert überein. Die wellenlängenabhängigen Anisotropien (Abb. 7.21b) streuen nur wenig um die gewichteten Mittelwerte. Die Abweichungen beim K-Intermediat für $650nm$ und $670nm$ sind vermutlich auf Fehler der Extrapolation zurückzuführen, fallen aber kaum ins Gewicht.

Die zeitlichen Verläufe der Intermediate (Abb. 7.21c), die sich aus der isotropen Absorptionsänderung nach Gl.(4.39) bzw. aus dem transienten Lineardichroismus nach Gl.(4.40) ergeben, sind zumindest im vorderen Zeitbereich nahezu identisch. Die Konzentrationszunahme des K-Intermediates im späten Zeitbereich ist ein Artefakt, der durch die Reduktion auf nur drei asymptotische Differenzspektren zu erklären ist. Vermutlich handelt es sich hier um ein rotverschobenes Nachfolgeintermediat des M-Zustandes. Für die frühen Intermediate hat dies jedoch keine Bedeutung. Die Gesamtkonzentration von K, L und M bleibt bis fast $10ms$ auf einem nahezu konstanten Wert, der der Anregungseffizienz entspricht.

7.3.3 Temperatureffekt im schwach sauren Milieu

Die Erniedrigung der Temperatur führt bei den meisten chemischen Reaktionen, wie auch bei den thermischen Relaxationsprozessen im bR-Photozyklus, zu einer Abnahme der mikroskopischen Raten. Bei Gleichgewichtsreaktionen ist damit i.allg. auch eine Verschiebung des Gleichgewichts verbunden. Um den Einfluß eines solchen Verhaltens auf die polarisationsabhängige Absorptionsänderung zu studieren, wurde die saure D96A-Probe (vgl. Kap. 7.3.2) auch bei einer Temperatur von $T = 10^\circ C$ untersucht. Der verlangsamte Photozyklus erforderte Meßzeiten von $2s$. Messungen bei höheren Temperaturen wurden wegen des Artefaktes durch 13-*cis* Überlagerung (vgl. Kap. 6.5.3) nicht durchgeführt. Die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ wurde für 13 Wellenlängen (390nm bis 670nm) bei nur drei Polarisationswinkeln ($\theta = 0^\circ, 40^\circ, 90^\circ$) gemessen, gemittelt wurde hierbei über 50 Einzelblitze. Die Behandlung der Meßdaten war ganz analog wie in den beiden vorangegangenen Kapiteln, daher werden die Ergebnisse in etwas gestraffter Form dargestellt.

Bei der isotropen Absorptionsänderung (Abb. 7.22a) ist zu erkennen, daß die Tendenz der pH-Abhängigkeit (von pH7 nach pH4.7 bei $T = 20^\circ C$) bei Temperaturerniedri-

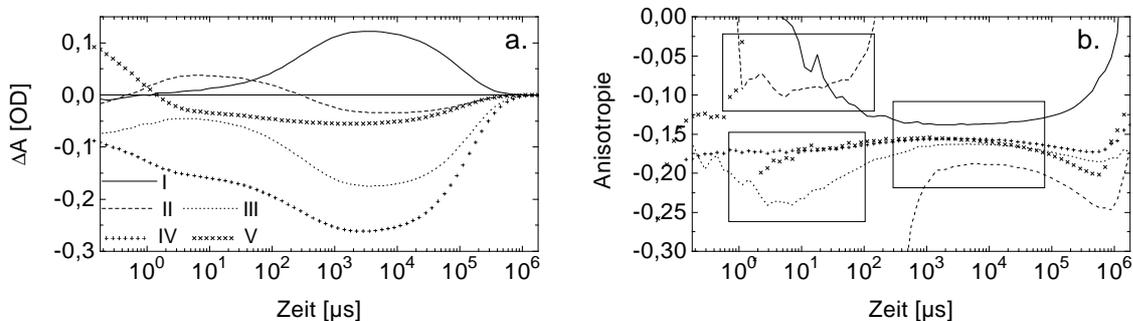


Abbildung 7.22: Berechnete Zeitspuren aus $\Delta A(\lambda, 0^\circ, t)$ und $\Delta A(\lambda, 90^\circ, t)$ für fünf ausgewählte Wellenlängen. I: $410nm$, II: $490nm$, III: $543nm$, IV: $570nm$, V: $635nm$. (a) (isotrope) Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$, (b) transiente Anisotropie $R(\lambda, t)$.

gung gewissermaßen fortgesetzt wird. Das Verhältnis der maximalen Absorptionsänderung $\Delta A(410\text{nm})/\Delta A(570\text{nm})$ beträgt nur noch ungefähr 0.47. Die Absorptionsänderung bei 490nm ist im ms -Bereich deutlich kleiner als bei 635nm , während bei $T = 20^\circ\text{C}$ nur eine geringe Differenz auftrat (vgl. Abb. 7.17a). Die Anisotropiezeitspuren (Abb. 7.22b) zeigen im μs -Bereich die typische Charakteristik der Mutante D96A, die offenbar nur wenig von den äußeren Bedingungen abhängt. Im Zeitbereich für $t \geq 1\text{ms}$ sind die Anisotropiezeitspuren dagegen empfindlicher von den Bedingungen abhängig und zeigen mehr oder weniger starke Abweichungen vom konstanten Verlauf. Die Anisotropiezeitspur bei 490nm ist noch deutlicher von der 570nm -Kurve abgesetzt und läßt auf einen entsprechend größeren Beitrag des L-Intermediats schließen.

Die Singulärwertzerlegung des kombinierten Datenfeldes $(\Delta\mathbf{A}, \Delta\mathbf{AR})^T$ lieferte die Singulärwerte $s = \{2.6912, 0.5162, 0.3829, 0.0417, 0.0101 \dots\}$. Der vierte Singulärwert $s_4 = 0.0417$ beträgt in diesem Falle fast 1.5% des ersten und ist daher auch als relevant zu betrachten. Die vier Basisspektren $\mathbf{S} = \mathbf{U}^T \mathbf{D}(s)$ (Abb. 7.23a) bzw. $\mathbf{S}^R = (\mathbf{U}^R)^T \mathbf{D}(s)$ (Abb. 7.23b) und die zugehörigen Zeitspuren \mathbf{V} (Abb. 7.23c) weisen eine vergleichbare Charakteristik auf wie bei $T = 20^\circ\text{C}$ (vgl. Abb. 7.19). Die globale Anpassung der vier Zeitspuren aus (Abb. 7.23c) erfolgte wieder mit zwei Potenzgesetzen ($\tau_1 = 0.80\mu s$, $n_1 = 3.5$ und $\tau_3 = 340\mu s$, $n_3 = 2.2$) und drei Exponentialfunktionen ($\tau_2 = 48\mu s$, $\tau_4 = 68\text{ms}$ und $\tau_5 = 170\text{ms}$). Die Abweichungen der Anpassung bezüglich der Daten sind für die Komponenten s_1 , s_2 und s_3 in Abb. 7.23d dargestellt.

Die aus den asymptotischen Differenzspektren $\tilde{\mathbf{B}}^A$ (Abb. 7.24a) und $\tilde{\mathbf{B}}^R$ (nicht gezeigt) gebildete Anisotropie $\tilde{\mathbf{R}}$ (Abb. 7.24b) zeigt in den beiden ersten Komponenten kaum Abweichungen gegenüber der Messung bei $T = 20^\circ\text{C}$. Die dritte Komponente läßt jedoch die Tendenz des zunehmenden Beitrages des L-Intermediates erkennen (vgl. Abb. 7.20c). Die „Krümmung“ der Anisotropiekurve im Wellenlängenbereich $490\text{nm} \leq \lambda \leq 670\text{nm}$ ist noch

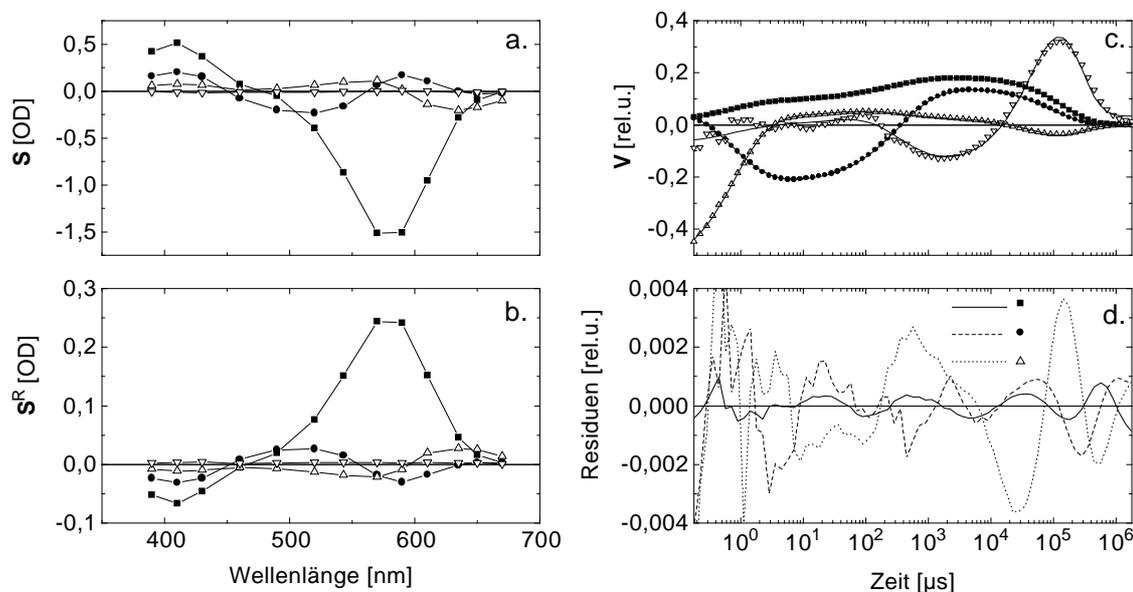


Abbildung 7.23: Ergebnis der SVD des Datenfeldes $(\Delta\mathbf{A}, \Delta\mathbf{AR})^T$. (a) Basisspektren der isotropen Absorptionsänderung: $\mathbf{S} = \mathbf{U}^T \mathbf{D}(s)$, (b) Basisspektren des transienten Lineardichroismus: $\mathbf{S}^R = (\mathbf{U}^R)^T \mathbf{D}(s)$, (c) zugehörige Zeitspuren \mathbf{V} , Symbole: Datenpunkte, Linien: Fitkurven. (d) Residuen der Komponenten s_1, s_2 und s_3 aus der globalen Anpassung der Zeitspuren. Zuordnung der Komponenten in (a,b,c): \blacksquare : $s_1 = 2.6912$, \bullet : $s_2 = 0.5162$, \triangle : $s_3 = 0.3829$, ∇ : $s_4 = 0.0417$.

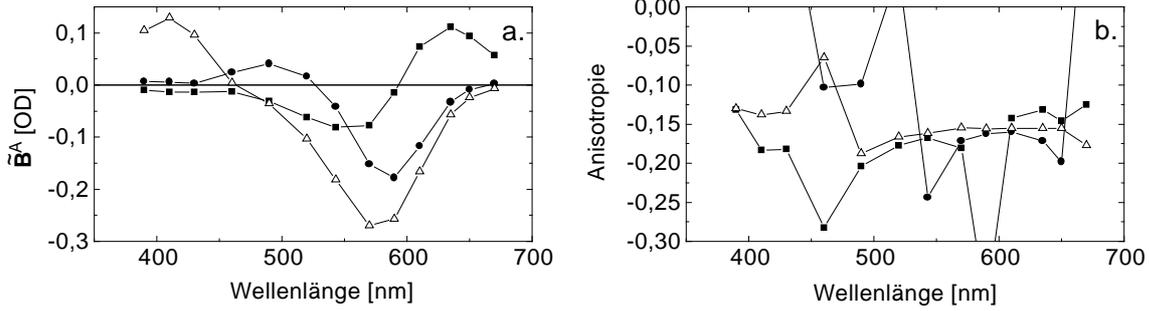


Abbildung 7.24: Asymptotische Differenzspektren: (a) \tilde{B}^A , (b) Anisotropie $\tilde{R} := \tilde{B}^R/\tilde{B}^A$. ■ : vor Relaxation 1, ● : vor Relaxation 2, △ : vor Relaxation 4.

verstärkt und der Datenpunkt bei 460nm liegt nun auf der anderen Seite der Singularität. Das Minimierungsverfahren liefert die Einträge der \tilde{C} -Matrix:

$$\tilde{C} = \begin{pmatrix} 0.436 & 0.050 & 0.024 \\ 0 & 0.381 & 0.208 \\ 0 & 0.005 & 0.204 \end{pmatrix}$$

Es ergibt sich also eine Anregungseffizienz von $\eta = 0.436$. Die Matrixelemente $(\tilde{C})_{23} = 0.208$ und $(\tilde{C})_{33} = 0.204$ ergeben nahezu gleiche Beiträge von L und M zum dritten asymptotischen Differenzspektrum. Für die Anisotropien ergab sich $r_K = -0.143$, $r_L = -0.137$ und $r_{bR} = -0.150$ aus dem Minimierungsverfahren, die mittleren Anisotropien wurden nach Gl.(4.35) bestimmt: $\bar{r}_K = -0.143 \pm 0.003$, $\bar{r}_L = -0.137 \pm 0.001$, $\bar{r}_{bR} = -0.150 \pm 0.001$ und $\bar{r}_M = -0.141 \pm 0.003$. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Messung bei $T = 20^\circ\text{C}$ und führen auf folgende Polarwinkel des Übergangsdipolmomentes: $\theta_K = 69.1 \pm 0.5^\circ$, $\theta_L = 68.4 \pm 0.2^\circ$ und $\theta_M = 68.9 \pm 0.5^\circ$.

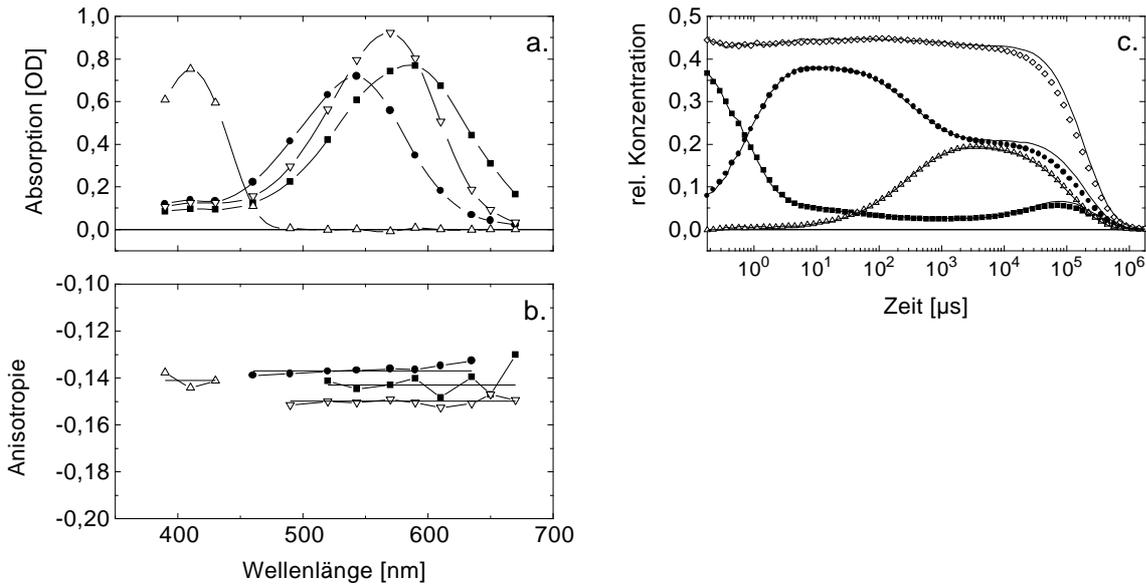


Abbildung 7.25: Ergebnis der Auswertung: (a) Intermediatenspektren A , (b) Anisotropie der Intermediate, Symbole: $(r_i)_\lambda$, — : \bar{r}_i , (c) zeitlicher Verlauf der Intermediate, Symbole: Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)$ nach Gl.(4.39), — : Berechnung aus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ nach Gl.(4.40). ■ : K, ● : L, △ : M. ▽ : bR, ◇ in (c): Konzentrationssumme von K, L und M.

Die Intermediatsspektren (Abb. 7.25a) sind ebenfalls praktisch unverändert. Dagegen ist der Einfluß der Temperatur in den zeitlichen Verläufe der Intermediate (Abb. 7.25c) klar zu erkennen. Da alle Relaxationen langsamer ablaufen, läßt sich vor allem der K-Zerfall besser verfolgen. Der erneute Anstieg in der Zeitspur des K-Intermediates, der einem Nachfolgeintermediat von M zuzuordnen ist (vgl. Abb. 7.21c), ist offenbar durch den niedrigen pH-Wert bedingt. Die relative Konzentration des L-Intermediates ist zu jedem Zeitpunkt größer als die des M-Intermediates. Im vorderen Zeitbereich gibt es keine signifikanten Abweichungen zwischen der Berechnung aus der isotropen Absorptionänderung (Gl.(4.39)) und aus dem transienten Lineardichroismus (Gl.(4.40)). Das Kriterium der Konzentrationserhaltung ist ebenfalls näherungsweise erfüllt.

7.4 Ergebnisübersicht zu den frühen Intermediaten

Die frühen Photozyklusintermediate wurden an orientierten PM von Wildtyp bR bzw. der Mutante D96A unter verschiedenen Bedingungen (siehe Kap. 7.1 bis 7.3.3) untersucht. Über den M-Zustand wurde auch Information aus einer photostationären Messung gewonnen (siehe Kap. 5.5). Die wichtigsten Ergebnisse sollen hier vergleichend dargestellt werden.

Die Intermediatsspektren, die aus den verschiedenen Experimenten resultierten, wurden auf die gleiche Grundzustandsabsorption bei $\lambda = 570nm$ normiert und sind separat für jedes Intermediat in Abb. 7.26 gezeigt. Das Spektrum des bR-Grundzustandes, welches aus der Gleichlichtmessung bestimmt wurde, ist für alle Proben nahezu identisch (Abb. 7.26d). Beim K-Spektrum (Abb. 7.26a) stimmen die Absorptionswerte im Maximum bei etwa $590nm$ sehr gut überein, nur in den Flanken gibt es Abweichungen von maximal 10%. Das K-Spektrum von Wildtyp ist um ca. $5nm$ gegenüber den K-Spektren von D96A rotverschoben. Die K-Spektren von D96A sind in der kurzwelligen Flanke völlig identisch, während das K-Spektrum aus der Messung bei pH7 und $T = 20^\circ C$ in der langwelligen Flanke um etwa

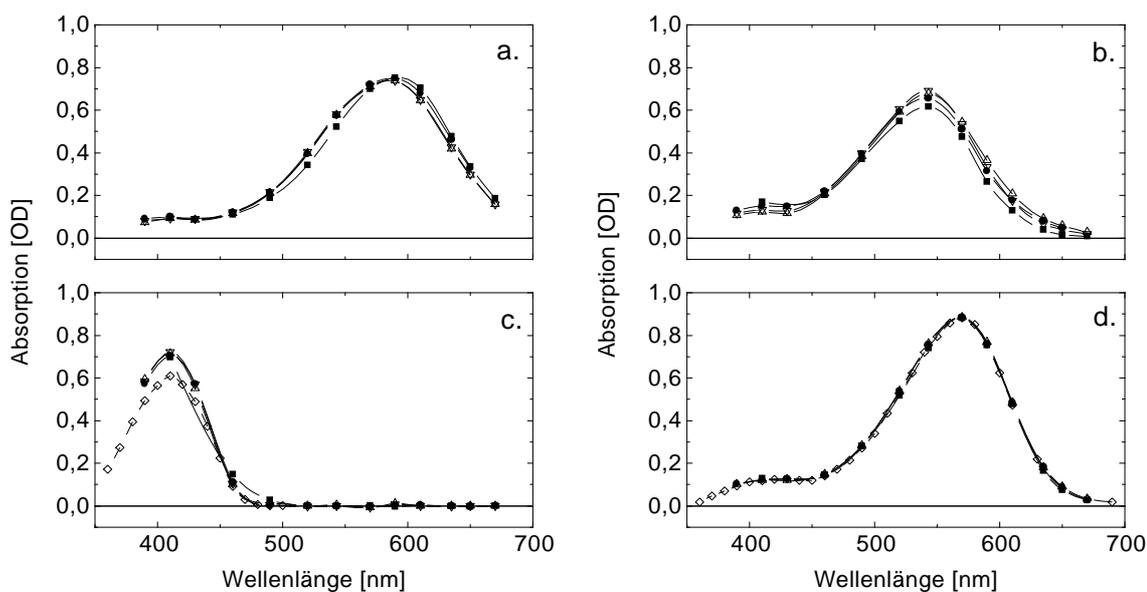


Abbildung 7.26: Intermediatsspektren aus den verschiedenen Experimenten (a) K, (b) L, (c) M, (d) Gleichlichtspektrum des bR-Grundzustandes bei $T \approx 20^\circ C$. ■ : Wildtyp, pH7, $T = 10^\circ C$; ● : D96A, pH7, $T = 20^\circ C$; △ : D96A, pH4.7, $T = 20^\circ C$; ▽ : D96A, pH4.7, $T = 10^\circ C$; ◇ : D96A, pH8, $T \approx 20^\circ C$, M-Zustand photostationär.

30 – 40 mOD größere Werte aufweist als die K-Spektren aus den beiden Messungen bei pH4.7. Es ist nicht auszuschließen, daß der niedrigere pH-Wert zu einer Änderung des inneren Feldes führt und so eine elektrochrome Verschiebung nachsichzieht. Das Absorptionsmaximum des L-Spektrums (Abb. 7.26b) liegt für alle Proben bei $(542 \pm 1)nm$, die Maximalwerte sind aber um bis zu 10% verschieden. Das L-Spektrum von Wildtyp hebt sich durch systematisch kleinere Absorptionswerte von den L-Spektren der Mutante D96A ab. Im Absorptionsmaximum des M-Spektrums (Abb. 7.26c) bei $410nm$ stimmen die Ergebnisse aus allen zeitaufgelösten Messungen bis auf $\pm 2\%$ überein. Dagegen ist der Absorptionswert des photostationären M-Zustandes um etwa 15% kleiner. Da eine unvollständige M-Akkumulation bei der photostationären Messung ausgeschlossen werden konnte (siehe Kap. 3.2.3), deutet diese Abweichung darauf hin, daß transienter und photostationärer M-Zustand in der Chromophorumgebung nicht völlig identisch sind.

Bei den zeitaufgelösten Messungen konnte für jede Meßreihe unter Verwendung des Grundzustandsspektrums die Anregungseffizienz η aus einer Erhaltungsbedingung (Gl.(4.41)) ermittelt werden. Die Gültigkeit der Erhaltungsbedingung war jedoch dadurch eingeschränkt, daß die Zeitkonstanten für die Übergänge zwischen den betrachteten Mischzuständen ausreichend getrennt sein mußten. Da es aus praktischen experimentellen Gründen nicht möglich war, alle Meßreihen bei exakt den gleichen Anregungsbedingungen durchzuführen, ergaben sich unterschiedliche Werte für die Anregungseffizienz. Es stellt sich natürlich die Frage, ob diese Werte aus Experimenten unter unterschiedlichen Bedingungen konsistent sind. Um die Meßreihen bezüglich der Anregungsbedingungen abzugleichen, wurden Vergleichsmessungen der isotropen Absorptionsänderung bei $570nm$ herangezogen. Die Maximalwerte dieser Messungen sind in Tab. 7.1 den entsprechenden Werten aus den analysierten Meßreihen gegenübergestellt.

Unter der Annahme, daß die Anregungseffizienzen für Wildtyp und D96A identisch sind und nicht von den äußeren Bedingungen (pH-Wert und Temperatur) abhängen, ergibt das Verhältnis der maximalen Absorptionswerte ein Maß für den Anteil der angeregten Moleküle. Damit lassen sich nun die Meßreihen bei unterschiedlichen Anregungsbedingungen vergleichen. Als absolute Bezugsgröße wurde der Wert der Anregungseffizienz aus der Er-

	Wildtyp, pH7 $T = 10^\circ C$	D96A, pH7 $T = 20^\circ C$	D96A, pH4.7 $T = 20^\circ C$	D96A, pH4.7 $T = 10^\circ C$
$\Delta A_{max}(570nm)$ [OD] gleiche Anreg.bed.	-0.332*	-0.347	-0.300	-0.290
$\Delta A_{max}(570nm)$ [OD] spezif. Anreg.bed.	-0.332	-0.300	-0.293	-0.261
η durch Vgl. von $\Delta A_{max}(570nm)$	0.420*	0.363	0.410	0.378
η nach Gl.(4.41)	0.420	0.383	0.447	0.436

Tabelle 7.1: Maximale Absorptionsänderungen bei $\lambda = 570nm$ unter gleichen Anregungsbedingungen (erste Zeile) und unter den spezifischen Anregungsbedingungen der jeweiligen Meßreihe (zweite Zeile). Gegenüberstellung der Anregungseffizienzen η berechnet aus dem Verhältnis der maximalen Absorptionsänderung (dritte Zeile) bzw. bestimmt aus der Erhaltungsbedingung (vierte Zeile). Die mit * gekennzeichneten Werte wurden als Bezugsgröße festgelegt.

haltungsbedingung für die erste Meßreihe (Wildtyp, pH7, $T = 10^\circ\text{C}$) gewählt. Die aus dem Absorptionsverhältnis bestimmten Anregungseffizienzen für die Meßreihen der Mutante D96A sind um 2%-Punkte (pH7, $T = 20^\circ\text{C}$), bzw. 3.7%-Punkte (pH4.7, $T = 20^\circ\text{C}$) und 5.8%-Punkte (pH4.7, $T = 10^\circ\text{C}$) kleiner als sich aus der Erhaltungsbedingung ergeben hatte (Tab. 7.1). Da die Intermediatsspektren, die auch unter Verwendung der Erhaltungsbedingung gewonnen wurden, vergleichsweise geringe Abweichungen zeigten – insbesondere stimmen die Absorptionswerte des M-Intermediates aus allen Meßreihen gut überein –, sind systematische Fehler bei der Bestimmung der Anregungseffizienz nach Gl.(4.41) in dieser Größenordnung⁴ nicht plausibel. Daraus kann nur der Schluß gezogen werden, daß die Annahme einer universalen Anregungseffizienz für das System bR nicht zutreffend ist. Für weitergehende Aussagen über systematische Abhängigkeiten sind die hier vorgestellten Ergebnisse aber nicht ausreichend.

In Tab. 7.2 sind die Winkeländerungen des Übergangsdipolmoments bezüglich der Membrannormalen in den frühen Intermediaten von allen Meßreihen zusammengefaßt. Die Orientierung des Übergangsdipolmoments wird offenbar nicht, bzw. nur sehr wenig, durch die Mutation an der Position 96 beeinflusst. Ebenso wenig hängt die Orientierung des Übergangsdipolmoments, zumindest bei der Mutante D96A, von den äußeren Bedingungen (pH-Wert und Temperatur) ab. Die geringen Änderungen bezüglich des Grundzustandes bzw. zwischen den frühen Intermediaten zeigen, daß die Orientierung des Übergangsdipolmoments kein empfindlicher Indikator für den Protonentransport sein kann.

	Wildtyp, pH7 $T = 10^\circ\text{C}$	D96A, pH7 $T = 20^\circ\text{C}$	D96A, pH4.7 $T = 20^\circ\text{C}$	D96A, pH4.7 $T = 10^\circ\text{C}$	D96A, pH8 $T \approx 20^\circ\text{C}$
$\Delta\theta_K$	$-0.7 \pm 0.3^\circ$	$-0.9 \pm 0.7^\circ$	$-0.9 \pm 0.5^\circ$	$-0.9 \pm 0.5^\circ$	
$\Delta\theta_L$	$-1.7 \pm 0.3^\circ$	$-2.0 \pm 0.2^\circ$	$-1.7 \pm 0.3^\circ$	$-1.6 \pm 0.2^\circ$	
$\Delta\theta_M$	$-0.8 \pm 0.5^\circ$ $-1.3 \pm 0.3^\circ \ddagger$ $-1.1 \pm 0.3^\circ \S$	$-1.3 \pm 0.2^\circ$	$-1.1 \pm 0.2^\circ$	$-1.1 \pm 0.5^\circ$	$-1.4 \pm 0.3^\circ \dagger$

Tabelle 7.2: Winkeländerungen des Übergangsdipolmoments bezüglich der Membrannormalen, $\Delta\theta_i := \theta_i - \theta_{bR}$, unter der Annahme, daß $\theta_{bR} = 70^\circ$. † Photostationäre Messung, ‡ Ergebnis einer unabhängigen Messung über mehrere Wellenlängen (Daten nicht gezeigt), § Mittelwert.

⁴Für die Meßreihe der Mutante D96A bei pH4.7 und $T = 10^\circ$ würde die Abweichung von 5.8%-Punkten bedeuten, daß die Anregungseffizienz um 15% überschätzt worden wäre.

7.5 Diskussion der Ergebnisse und des methodischen Ansatzes

7.5.1 Die transienten Änderungen der linearen Doppelbrechung

Transiente Doppelbrechungsänderungen im Photozyklus von bR wurden mittels zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie mit linear polarisiertem Licht bestimmt. In Analogie zu den phasensensitiven Gleichlichtmessungen (vgl. Kap. 5) wurde die Transmission einer orientierten PM-Probe, die im Meßlicht zwischen zwei „parallelen“ Polarisatoren positioniert war, nach quasi-isotroper, nahezu sättigender Anregung gemessen. Bei perfekter isotroper Anregung entspricht die Verteilung der angeregten bR-Moleküle der permanenten Verteilung der Moleküle aufgrund der Orientierung der Membranen. Unter dieser Voraussetzung konnte die funktionale Abhängigkeit des Meßsignals vom Polarisationswinkel hergeleitet werden, die die transiente Doppelbrechungsänderung als Parameter enthält.

Im Hinblick auf die Empfindlichkeit der Meßmethode ist die Verwendung von orientierten Proben in Verbindung mit isotroper Anregung vergleichbar mit Photoselektionsexperimenten an dünnen Filmen [Tka89]. Bei der hier verwendeten Methode hängt das Signal $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ vom Kosinus der gesamten transienten Phasendifferenz $\Delta\phi_E(t)$ ab (siehe Gl.(4.10)), die i.allg. wesentlich größer ist, als die Änderung der Phasendifferenz $\Delta\Delta\phi(t)$ aufgrund der Doppelbrechungsänderung $\Delta\Delta n(t)$ der Probe. Daher ist der Bereich niedrigster Empfindlichkeit bei $\Delta\phi_E = 0^\circ$, während hohe Empfindlichkeit bei $\Delta\phi_E = \pm 90^\circ, \pm 270^\circ$ vorliegt. Für Phasendifferenzen zwischen 90° und 270° ist die Kosinusabhängigkeit aber offenbar nicht allein ausschlaggebend für die Empfindlichkeit. Die zeitaufgelösten Messungen am anisotrop gequollenen Gel (siehe Kap. 7.2) hatten gezeigt, daß bei einer Phasendifferenz im Bereich von $\approx \pm 180^\circ$ Änderungen $\Delta\Delta\phi(t)$ mit einer hohen relativen Genauigkeit bestimmt werden können. Auf einen formalen Beweis sei hier aber verzichtet. Die permanenten Phasendifferenzen im Bereich von etwa 15° bis 45° der magnetisch orientierten Proben erlaubten immerhin eine recht genaue Bestimmung der Doppelbrechungsänderung für Zeitpunkte $t \geq 10\mu s$. Wegen der logarithmischen Datenreduktion (Mittelung) werden die Kurven mit fortschreitender Zeit immer glatter.

Ein wichtiger Vorteil der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode liegt in der praktischen Anwendbarkeit: Es sind lediglich zwei Polarisatoren im Meßstrahl notwendig, so daß über einen Spektralbereich von $390nm$ bis $670nm$ gemessen werden kann. Im Gegensatz dazu verwendet die Photoselektionsmethode ein Verzögerungsplättchen, das für eine ganz bestimmte Wellenlänge spezifiziert ist. Der Abgleich der beiden Polarisatoren ist relativ unkritisch – eine Verstimmung um $\pm 0.5^\circ$ hat nahezu keinen Einfluß auf das Meßsignal –, während die exakte Justierung des Verzögerungsplättchens essentiell bei der Photoselektionsmethode ist. Bei Experimenten mit dieser Methode [Tka89] wurde die Information über die Doppelbrechungsänderung aus Messungen bei vier Winkeln einer ausgezeichneten Achse des Verzögerungsplättchens gewonnen, wobei die Winkel nur um jeweils $\pm 0.5^\circ$ verschieden waren.

Ein weiterer Vorteil der Methode „paralleler“ Polarisatoren ist durch die formal exakte und dabei noch übersichtliche Beschreibung gegeben, die experimentell verifiziert wurde. Dagegen gelten die mathematischen Ausdrücke, die Tkachenko et al. [Tka89] angeben, nur im Grenzfall schwacher Anregung und hinreichend kleinen Änderungen der Phasendifferenz. Die richtige quantitative Interpretation, nämlich der Zusammenhang mit dem Spektrum der Absorptionsänderung über die Kramers–Kronig–Relationen, wurde von diesen Autoren

mangels Datenmaterials⁵ nur spekulativ in Erwägung gezogen. Die spektrale Abhängigkeit der transienten Doppelbrechungsänderungen zeigte in der vorliegenden Arbeit (im Rahmen der Meßgenauigkeit) sehr gute Übereinstimmung mit den Berechnungen aus dem transienten Lineardichroismus über die Kramers–Kronig–Relation nach Gl.(4.14). Die Gültigkeit dieser spektralen Beziehung bei überlagerten Chromophorzuständen war durch ein interferometrisches Verfahren [Zei92] gezeigt worden, doch diese Methode lieferte keine hohe relative Genauigkeit, sie war mit einer Normierungsunsicherheit behaftet und konnte nur auf photostationäre Zustände angewandt werden. Mit der zeitaufgelösten Methode können dagegen transiente Zustände untersucht werden.

7.5.2 Die Intermediatsspektren und deren zeitlicher Verlauf

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Formalismus entwickelt, der Information über die frühen Intermediate und ihre zeitlichen Verläufe im bR–Photozyklus liefert. Eine globale Anpassung der experimentell gewonnenen Zeitspuren ($\Delta A(\lambda, t)$ und $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$) und die anschließende Konstruktion der asymptotischen Differenzspektren sind nützliche Auswertungsschritte, die eine Glättung und Reduktion der Daten bewirken. Der Umweg über die Singulärwertzerlegung stellt einen weiteren Filter dar und vermindert den numerischen Aufwand bei der globalen Anpassung. Die asymptotischen Differenzspektren sind über die Transformationsmatrix $\tilde{\mathbf{C}}$ mit den Absorptionsspektren der Intermediate verknüpft, d.h. die Elemente von $\tilde{\mathbf{C}}$ geben die relativen Beiträge der Intermediate K,L und M in den extrapolierten überlagerten Zuständen an. Durch die aus dem transienten Lineardichroismus resultierende zusätzliche Information kann ein Gleichungssystem (siehe Gl.(4.30)) aufgestellt werden, das als Unbekannte nur noch die Elemente von $\tilde{\mathbf{C}}$ und die Anisotropien der Intermediate enthält. Die Intermediatsspektren, die nicht als bekannt vorausgesetzt werden können, bzw. nur qualitativ bekannt sind und möglicherweise von den äußeren Bedingungen (pH–Wert und Temperatur) abhängen, sind dadurch eliminiert. Das Gleichungssystem hat nur dann eine nichttriviale Lösung, wenn die Intermediatsanisotropien verschieden sind. Um eine eindeutige und physikalisch relevante Lösung zu finden, wurden folgende Nebenbedingungen verwendet:

1. Die Summe der Beiträge von K, L und M ist für alle drei asymptotischen Differenzspektren gleich.
2. Das M–Intermediat trägt im Wellenlängenbereich $\lambda \geq 500nm$ nicht zur Absorption bei.
3. Im ersten asymptotischen Differenzspektrum, d.h. in der jeweils ersten Spalte von $\tilde{\mathbf{B}}^A$ und $\tilde{\mathbf{B}}^R$, liefert nur das K–Intermediat einen Beitrag.

Mit Hilfe dieser Nebenbedingungen läßt sich ein Teil der unbekannt Parameter sogar quasi–analytisch aus den asymptotischen Differenzspektren $\tilde{\mathbf{B}}^A$ und dem Absorptionsspektrum des Grundzustandes \tilde{A}_{bR} bestimmen. So ergibt sich die Anregungseffizienz ($\eta \equiv x_1$), die der Konzentrationssumme von K,L und M entspricht, explizit, und die restlichen Einträge von $\tilde{\mathbf{C}}$ lassen sich durch zwei unabhängige Parameter ausdrücken. Da die Matrixelemente von $\tilde{\mathbf{C}}$ positiv sein müssen und nur positive Absorptionswerte zugelassen sind, ist der Bereich dieser Parameter eingeschränkt. Eine mathematisch eindeutige Lösung ergibt sich aber

⁵Es wurde nur bei einer einzigen Wellenlänge $\lambda = 633nm$ gemessen.

nur unter Verwendung der Differenzspektren $\tilde{\mathbf{B}}^R$, die aus dem transienten Lineardichroismus $\Delta A(\lambda, t)R(\lambda, t)$ resultierten. Dadurch tritt allerdings ein weiterer unbekannter Parameter hinzu (die Anisotropie von L), der auch in Produkten mit den anderen Parametern erscheint, so daß zur Lösung des Problems ein nichtlineares Minimierungsverfahren erforderlich ist. Anstelle dieser sukzessiven Vorgehensweise gelingt es in den meisten Fällen auch, alle unbekannt Parameter simultan durch eine geeignete Minimierungsprozedur unter Berücksichtigung der Nebenbedingungen zu bestimmen. Da die Anisotropien der Intermediate aber relativ dicht zusammenliegen, ist das gesuchte Minimum im multidimensionalen Raum nicht besonders scharf ausgeprägt und teilweise schwer von lokalen Nebenminima zu unterscheiden. Um zu beurteilen, ob eine gefundene Lösung physikalisch tatsächlich relevant ist, sind die resultierenden Intermediatsspektren und ihre zeitlichen Verläufe zu betrachten. Lösungen, die auf Spektren mit mehreren Maxima führen, oder „unvernünftige“ Konzentrationsverläufe⁶ erzeugen, sind zu verwerfen. Ein strenges bzw. absolutes Kriterium kann aber nicht angegeben werden.

Rein formal sollte sich eine eindeutige Lösung auch aus den SVD-Basispektren \mathbf{S} und \mathbf{S}^R nach Gl.(4.52) gewinnen lassen, also ohne eine Anpassung der zeitlichen Verläufe und der Konstruktion der asymptotischen Differenzspektren. Um die Konzentrationserhaltung ($\sum_{i=1}^3 n_{i,t} = \eta$) in der kompakten Form von Gl.(4.53) verwenden zu können, ist dazu eine SVD der reduzierten Datenfelder erforderlich. Bezüglich der Eingrenzung des Zeitbereichs besteht natürlich eine gewisse Willkür. Zudem ergibt sich die Schwierigkeit, daß die Einträge der Transformationsmatrix \mathbf{X} sowohl positive als auch negative Werte annehmen können. Wegen des relativ schnellen K-Zerfalls fehlt einerseits die definierte Anfangsbedingung (vgl. Nebenbedingung 3) und andererseits hat das K-Intermediat zuwenig Gewicht in den Basispektren. Erschwerend kommt hinzu, daß die Anisotropien der Intermediate nur wenig verschieden sind. Mit dem zur Verfügung stehenden Datenmaterial ist es jedenfalls nicht gelungen, aus den SVD-Basispektren eine physikalisch sinnvolle Lösung zu ermitteln.

Grundsätzlich stellt sich auch die Frage, ob es günstiger ist, die zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderung bei diskreten Wellenlängen aufzunehmen, oder aber, wie bei sogenannten OMA-Messungen in Verbindung mit der Pump-and-Probe-Technik, für diskrete Zeitpunkte ganze Differenzspektren zu erfassen. Die OMA-Daten liefern zwar einen höheren Gehalt an spektraler Information, doch die Genauigkeit in der zeitlichen Dimension ist niedriger als bei den zeitaufgelösten Messungen bei diskreten Wellenlängen. Üblicherweise werden die OMA-Messungen unpolarisiert oder nur bei einem Polarisationswinkel, dem sogenannten magischen Winkel $\theta = 54.7^\circ$, durchgeführt. Dadurch ist nicht garantiert, daß das Signal frei von Polarisationsartefakten ist. Im Gegensatz dazu, erlaubt die Messung der polarisationsabhängigen Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, \theta, t)$ die isotrope Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ aus dem Signal zu extrahieren.

Obwohl die unpolarisierte Absorptionsmessung zuwenig Information liefert, um eine mathematisch eindeutige Lösung zu finden, gibt es in der Literatur einige Ansätze [Zim93, Ger97], dieses Problem durch die Implementierung einer hohen Anzahl von Nebenbedingungen zu lösen. Diese Nebenbedingungen entsprechen in etwa den Kriterien, die oben zur Beurteilung der physikalischen Relevanz der ermittelten Lösung formuliert sind. Der numerische Aufwand solcher Verfahren (Gittersuchverfahren [Zim93] oder Monte Carlo Verfahren [Ger97]) ist aber i.allg. viel höher, und das Ergebnis hängt möglicherweise stark vom

⁶Es dürfen keine negativen Konzentrationen auftreten, die Konzentrationssumme von K,L und M muß solange konstant bleiben, bis der M-Aufbau zum größten Teil erfolgt ist, außerdem darf die Konzentration eines Intermediates nach einer Abnahme nicht wieder zunehmen.

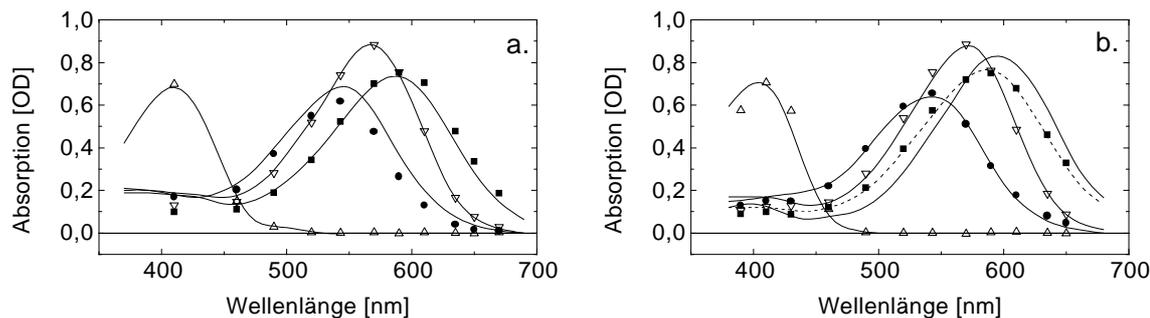


Abbildung 7.27: Vergleich mit den Intermediatsspektren anderer Autoren. (a) Wildtyp, Linien: Gergely et al. [Ger97], Symbole: diese Arbeit (siehe Kap. 7); (b) D96A/N, durchgezogene Linien: Zimányi et al. [Zim93], gestrichelte Linie: Nagle et al. [Nag95], Symbole: diese Arbeit (pH7, $T = 20^\circ\text{C}$, siehe Kap. 7.3.1). ■ : K, ● : L, △ : M, ▽ : bR.

Minimierungskriterium, d.h. der Gewichtung der Nebenbedingungen, ab. Die Intermediatsspektren, die aus der Anwendung dieser Verfahren auf OMA-Daten von Wildtyp [Ger97] bzw. D96N⁷ [Zim93] resultierten, sind zusammen mit den in dieser Arbeit gefundenen Absorptionswerten in Abb. 7.27 dargestellt. Die Abweichungen im kurzwelligen Spektralbereich sind dadurch bedingt, daß die in dieser Arbeit durchgeführte Streukorrektur des bR-Grundzustandsspektrums (siehe Abb. 5.3) von anderen Autoren nicht berücksichtigt wird. Konsequenterweise sollten diese Abweichungen dann auch beim M-Spektrum auftreten, was jedoch nicht der Fall ist. Dem M-Spektrum von D96N nach [Zim93] in Abb. 7.27b liegt vermutlich ein Fehler der Wellenlängeneichung zugrunde, denn über die Lage des Absorptionsmaximums des M-Zustandes bei $410 \pm 2\text{nm}$ besteht allgemeiner Konsens. Bei den Wildtypspektren (Abb. 7.27a) gibt es für den K-Zustand bis auf geringfügige Abweichungen in der langwelligen Flanke gute Übereinstimmung. Für den L-Zustand stimmen zwar die Absorptionsmaxima recht gut überein, doch die Absorptionswerte nach [Ger97] sind um ca. 10% größer. Beim modifizierten System (Abb. 7.27b) weicht dagegen das K-Spektrum nach [Zim93] nicht unerheblich ab, während für das L-Spektrum sehr gute Übereinstimmung besteht. Ausgehend von den bei [Zim93] verwendeten Meßdaten wurde in einer späteren Arbeit [Nag95] durch Extrapolation der Absorptionsänderung zum Zeitnullpunkt ein Spektrum für den K-Zustand ermittelt (gestrichelte Linie in Abb. 7.27b), das mit dem K-Spektrum für D96A (pH7, $T = 20^\circ$) dieser Arbeit nahezu identisch ist.

Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung der Intermediatsspektren und den zeitlichen Verläufen setzt die Temperaturinvarianz der Spektren voraus [Nag91, Thi94]. Im Formalismus, der die asymptotischen Differenzspektren verwendet, würde dies bedeuten, daß $\tilde{\mathbf{B}}^A$ und $\tilde{\mathbf{C}}$ temperaturabhängig sind, während $\mathbf{A} - \mathbf{A}_{bR}$ nicht von der Temperatur abhängt. Betrachtet man nun die Datensätze aus Messungen bei drei verschiedenen Temperaturen, dann ergibt sich aus Gl.4.26 die folgende Matrizenbeziehung:

$$\tilde{\mathbf{B}}^A(T_1) \tilde{\mathbf{C}}^{-1}(T_1) = \tilde{\mathbf{B}}^A(T_2) \tilde{\mathbf{C}}^{-1}(T_2) = \tilde{\mathbf{B}}^A(T_3) \tilde{\mathbf{C}}^{-1}(T_3)$$

Diese Beziehung ergibt aber nur zwei unabhängige Matrixgleichungen, in denen drei unbekannte Matrizen ($\tilde{\mathbf{C}}^{-1}(T_1)$, $\tilde{\mathbf{C}}^{-1}(T_2)$ und $\tilde{\mathbf{C}}^{-1}(T_3)$) erscheinen, d.h. ohne Nebenbedingungen ist dieses Gleichungspaar unterbestimmt. Unter Verwendung der Nebenbedingungen 1 und 3 läßt sich aber eine eindeutige Lösung finden, vorausgesetzt, es tritt keine Entartung ein.

⁷Der Photozyklus dieser Mutante hat nahezu die gleiche Charakteristik wie der Zyklus von D96A

Falls sich nämlich alle Zeitkonstanten im gleichen Maße mit der Temperatur ändern, wären die $\tilde{\mathbf{C}}$ -Matrizen bei allen Temperaturen gleich, und die Matrizenbeziehungen liefern überhaupt keine Information mehr. Probleme ergeben sich auch dadurch, daß der K-Zerfall bei höherer Temperatur $T \approx 40^\circ$ stark beschleunigt ist, und die zeitliche Auflösung keine genaue Extrapolation zum Zeitnullpunkt erlaubt. Außerdem ist bei diesen Temperaturen unter den normalen Meßbedingungen der 13-*cis* Zyklus mit einem Anteil von mindestens 5% überlagert (siehe Kap. 6.5.3), was im formalen Ansatz nicht berücksichtigt ist.

Auch ohne solche Komplikationen ist das Auffinden einer numerischen Lösung offenbar extrem rauschempfindlich, wie in Simulationsrechnungen nachgewiesen wurde [Nag91]. Die Anpassung von Meßdaten, die bei drei oder mehr Temperaturen aufgenommen wurden, lieferte bisher keine überzeugenden und allgemein akzeptierten Ergebnisse [Thi94]. Da selbst die Voraussetzung der Temperaturinvarianz der Spektren nicht gesichert, wahrscheinlich sogar nicht erfüllt ist, verspricht dieser Ansatz wenig Erfolg. Dagegen liefert die in dieser Arbeit entwickelte Methode, trotz der relativ dicht beieinanderliegenden Anisotropien, ein in sich konsistentes Ergebnis.

7.5.3 Die Reorientierung des Übergangsdipolmoments

Durch zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie mit linear polarisiertem Licht wurden die Winkel des Übergangsdipolmoments bezüglich der Membrannormalen in den Intermediaten K, L und M im Photozyklus von bR und der Mutante D96A bestimmt. Die Winkeländerungen bezüglich des bR-Grundzustandes sind relativ klein ($\Delta\theta_i \leq 2^\circ$). Die Methode der isotropen Anregung von orientierten PM-Proben erlaubt nahezu sättigende Anregungsintensität, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis außerordentlich gut ist. Dagegen erfordern Photoselektionsexperimente infinitesimale Anregungsintensität, was ein entsprechend schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis nachsichzieht. Solche Experimente wurden sowohl an isotropen [Kar82, Son94, Esq96] als auch an orientierten [Hey92, Son96] Proben durchgeführt. Während die Messungen an isotropen Systemen nur Information über die (totale) Winkeländerung des Übergangsdipolmoments bezüglich des bR-Grundzustandes ($\Delta\Omega_i$) liefern, sind bei den Experimenten mit orientierten Proben der Polarwinkel (θ_i) und die Änderung im Azimutalwinkel ($\Delta\phi_i$) des Übergangsdipolmoments im Membransystem zugänglich.

In beiden Fällen wurden widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Während die Autoren Song et al. [Son94] für PM-Suspensionen sehr große Änderungen ($\Delta\Omega_K = 11^\circ$, $\Delta\Omega_L = 17^\circ$ und $\Delta\Omega_M = 20^\circ$) angaben, zeigten die Daten von Esquerra et al. [Esq96] „Invarianz“ der Anisotropie im Zeitbereich von $50ns$ bis $50\mu s$, woraus zu schließen ist, daß sich die Richtung des Übergangsdipolmoments in diesem Zeitbereich (K und L) im Rahmen der Meßgenauigkeit ($\pm 8^\circ$!) nicht ändert. Letzteres Ergebnis bestätigt auch ein früheres Experiment [Kar82], das eine Änderung des Übergangsdipolmoments von höchstens 10° ergeben hatte.

Nach [Son94], reduziert die Immobilisierung der Membranen in einem PAA-Gel die Reorientierung des Chromophors, verhindert diese aber nicht vollständig. Ein Einfluß der Immobilisierung auf die innere Struktur des Proteins ist aber wenig plausibel und auch experimentell nicht weitergehend bestätigt, denn die spektralen und funktionellen Eigenschaften der Purpormembran (Photozyklus, Protonentransport und Licht-Dunkel-Adaptation) sind durch die Immobilisierung nicht gestört. Dieselben Autoren haben zur Erklärung ihrer Meßdaten ein sogenanntes „Spectator-Model“ eingeführt [Wan93], das von einer Reorientierung des Chromophors der nichtangeregten bR-Moleküle im Trimer während des Photozyklus (der angeregten Moleküle) ausgeht. Diese Reorientierung wird einem Kooperativitätseffekt im Trimer zugeschrieben, wobei aber offen gelassen wird, wodurch die Wechselwirkung zwischen

den Monomeren vermittelt werden könnte. Dieses gewagte Modell, das frühere Überlegungen von Ahl und Cone [Ahl84] wiederaufgreift, ist aber nicht allgemein akzeptiert.

Frühere Messungen an orientierten (und immobilisierten) PM-Proben [Ott91, Hey92] zeigten, daß das Übergangsdipolmoment im Übergang zum M-Intermediat um ca. 3° aus der Membranebene kippt, d.h. der Polarwinkel in diesem Intermediat ist also etwas kleiner als im bR-Grundzustand ($\Delta\theta_M = -3^\circ$). Im Gegensatz dazu, wollten Song et al. [Son96] mit fast exakt der gleichen Methode⁸ eine Winkeländerung von 14° gefunden haben. Für die Intermediate K und L beobachteten sie jedoch nur eine Reorientierung von 3° . In der Membranebene wurde im Rahmen der Meßgenauigkeit ($\pm 7^\circ$) keine Reorientierung festgestellt. Interessanterweise kommen beide Autorengruppen ([Ott91] und [Son96]) trotz unterschiedlicher Ergebnisse für die Intermediate auf den gleichen Wert des Übergangsdipolmoments im bR-Grundzustand ($\theta_{bR} = 67^\circ$), der jedoch, nach den Erkenntnissen aus Gleichlichtmessungen (siehe Kap. 5.3 und [Kap96]), um mindestens 3° zu klein ist.

Bei den Experimenten an orientierten Proben mit isotroper Anregung geht zwar aus Symmetriegründen die Information über den Azimutalwinkel verloren, doch dafür ist die Information über den Polarwinkel sehr viel genauer. Durch die isotrope, beinahe sättigende Anregung sind die Signale nur wenig verrauscht, und außerdem ist die formale Beschreibung sehr viel einfacher als bei Photoselektionsexperimenten. Bezüglich des bR-Grundzustandes wurden in den Intermediaten K, L und M kleinere Polarwinkel des Übergangsdipolmoments gefunden: $\Delta\theta_K = -0.7 \pm 0.3^\circ$, $\Delta\theta_L = -1.7 \pm 0.3^\circ$ und $\Delta\theta_M = -1.1 \pm 0.3^\circ$ (siehe Tab. 7.2). Nahezu die gleichen Werte ergaben sich auch bei der Mutante D96A, bei der außerdem, im Rahmen der Meßgenauigkeit, keine signifikante Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur festgestellt wurde. Der Wert für das M-Intermediat ist zwar etwas kleiner, doch qualitativ in Übereinstimmung mit früheren Experimenten [Ott91, Hey92]. Im Vergleich mit [Son96] sind die Werte für K und L zwar noch halbwegs kompatibel, doch für M besteht eine große Diskrepanz. Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde die lineare Doppelbrechung als unabhängiger Parameter bestimmt, so daß über die Kramers-Kronig-Relationen eine Kontrolle des transienten Lineardichroismus möglich war. Aus den gemessenen Daten ergibt sich keine Notwendigkeit, eine „Spectator“-Reorientierung zuzulassen. Daher werden die nichtangeregten bR-Moleküle als unbeteiligte Nachbarn während des Photozyklus der angeregten Moleküle betrachtet. Der Ansatz für den transienten Lineardichroismus (Gl.(4.12)) hatte dies implizit vorausgesetzt.

Die kleinen Orientierungsänderungen des Übergangsdipolmoments in den Intermediaten K, L und M legt ein Modell für die Reorientierung des Chromophors nahe, das bereits ausführlich von Heyn und Otto [Hey92] diskutiert wurde und in Kap. 5.6 zur Betrachtung der 13-*cis*, 15-*anti* Konformation des photostationären M-Zustandes wieder aufgegriffen wurde. Demnach ist die 13-*cis* Isomerisierung mit einer Bewegung der C₁₉- und der C₂₀-Methylgruppe in Richtung der zytoplasmatischen Seite der Membran verbunden, während der Verbindungsvektor vom C₅-Atom zum N-Atom der SB nur eine geringe Reorientierung ($\leq 2^\circ$) erfährt (siehe Abb. 5.14). Dieses Modell ist in Einklang mit Neutronenbeugungsexperimenten [Hau94], die zeigten, daß die Lage des β -Iononrings im M-Zustand unverändert gegenüber dem bR-Grundzustand ist. Da die Polyenkette vermutlich nicht gestreckt werden kann, müßte das N-Atom der SB also infolge der Isomerisierung nach 13-*cis*, 15-*anti* in Richtung des β -Iononrings ausgelenkt werden, wodurch über die Seitenkette des Lys-216 eine Wechselwirkung mit dem Proteinrückgrat vermittelt wird. Eine Wechselwirkung zwischen den C₁₉- und C₂₀-Methylgruppen und benachbarten Aminosäureseitenketten (Trp-182 und

⁸Der einzige Unterschied bestand in der koaxialen Meßgeometrie von Song et al. [Son96].

Leu-93 [Lue98]) könnte ebenfalls funktionell relevant sein. Zeitaufgelöste optische Experimente im sichtbaren Spektralbereich und FTIR Differenzspektroskopie an 9-Desmethyl-bR bzw. der Mutante W182F [Wei96] hatten gezeigt, daß die *Reisomerisierung*, d.h. von 13-*cis* nach all-*trans*, durch die sterische Wechselwirkung zwischen der C₁₉-Methylgruppe und Trp-182 kontrolliert wird. Über die Funktion dieser Wechselwirkung im Bezug auf die Isomerisierung, also der Schritt von all-*trans* nach 13-*cis*, gibt es aber keine Angaben. Da sich die Chromophororientierungen in der 13-*cis*, 15-*syn* Konformation und der 13-*cis*, 15-*anti* Konformation praktisch nicht unterscheiden (siehe Abb. 5.14), funktionell jedoch kein Zusammenhang zwischen Licht-Dunkel-Adaptation und lichtinduziertem Protonentransport besteht, erscheint die funktionelle Relevanz der sterischen Wechselwirkung wenig plausibel. Die hier dargestellten Überlegungen sind natürlich nur relevant, wenn die Richtung des Übergangsdipolmoments auch nach der Isomerisierung und der Deprotonierung der SB mit dem Verbindungsvektor vom C₅-Atom zum N-Atom der SB identifiziert werden kann. Aktuelle Ergebnisse theoretischer Berechnungen liegen dazu aber leider nicht vor.