

Femtosekundenspektroskopie an photosynthetischen Systemen:

Elektronentransfer in Purpurbakterien und
Isomerisierung des Retinals in Bakteriorhodopsin



**Dissertation der Fakultät für Physik
der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von Petra Huppmann
aus Starnberg

München, den 2. Februar 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Zinth

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Hänsch

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 2000

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Primärreaktionen zweier verschiedener biologischer Systeme: der Elektronentransfer in Reaktionszentren des Purpurbakteriums *Rhodospseudomonas viridis* und die schnelle Isomerisierung des Retinals in Bakteriorhodopsin des *Halobacterium salinarum*. Da sowohl der Elektronentransfer in den Reaktionszentren als auch die Isomerisierung des Retinals sehr schnell (zwischen 200 fs und 3.5 ps) ablaufen, und eine mögliche Wellenpaketsbewegung aufgelöst werden sollte, war es äußerst wichtig, die Experimente mit ultrakurzen Impulsen durchzuführen. Dies wurde durch den Einsatz nichtkollinearer optisch parametrischer Verstärker zur Erzeugung energiereicher kurzer Anreg- und Abtastimpulse ermöglicht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Temperaturabhängigkeit der ersten beiden Elektronentransferschritte in nativen und mutierten Reaktionszentren von *Rhodospseudomonas viridis* untersucht. In allen Reaktionen konnte eine Beschleunigung der Elektronentransferreaktion mit Abnahme der Temperatur beobachtet werden, besonders auffallend war jedoch die starke Beschleunigung des ersten Elektronentransferschrittes der Mutante und des zweiten Elektronentransferschrittes im Wildtyp und in der Mutante zwischen Raumtemperatur und 130 K, und die nur noch sehr schwache Beschleunigung bei weiterem Abkühlen. Dieses Verhalten konnte im Rahmen der nichtadiabatischen Elektronentransfertheorie - auch unter Berücksichtigung der Wärmeausdehnung - nicht mehr erklärt werden. Auch die Analyse der Oszillationen, die dem Meßsignal überlagert sind, und die Berechnung des Landau-Zener-Faktors, der als Unterscheidungskriterium für die Adiabaticität einer Reaktion dient, ergeben, daß der primäre Elektronentransfer der Mutante bei tiefen Temperaturen adiabatisch ist. Eine Erweiterung der Elektronentransfertheorie für den adiabatischen Fall verbessert allerdings die Datenanpassung nicht. Eine alternative Theorie, bei der ein Zusammenhang zwischen elektronischer Kopplung und Energie der Zustände angenommen wird, kann die Temperaturabhängigkeit aller bisher beobachteten Elektronentransferprozesse in photosynthetischen Reaktionszentren erklären.

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßte sich mit der Isomerisierung von Retinal in Bakteriorhodopsin. Durch Experimente mit höchster Zeitauflösung (< 40 fs) und variablen Anreg- und Abtastwellenlängen sollten Diskrepanzen in bisherigen Isomerisierungsmodellen ausgeräumt werden. Die hohe Zeitauflösung ermöglichte außerdem die Beobachtung ausgeprägter Oszillationen vor allem im sichtbaren Spektralbereich. Unter Berücksichtigung der Oszillationsfrequenzen, die auf eine Wellenpaketsbewegung im angeregten Zustand zurückzuführen sind, und der gemessenen Reaktionszeiten von 200 fs, 500 fs und 3.5 ps konnte ein modifiziertes Reaktionsmodell für Bakteriorhodopsin vorgeschlagen werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Elektronentransfer in Reaktionszentren des Bakteriums <i>Rhodospseudomonas viridis</i>	3
2.1	Das bakterielle Reaktionszentrum von <i>Rps. viridis</i>	3
2.2	Elektronentransfertheorie	8
2.2.1	Voraussetzungen	8
2.2.2	Fälle und Unterscheidungskriterien	10
2.2.2.1	Nichtadiabatischer Fall	11
2.2.2.2	Adiabatischer Fall	13
2.2.3	Temperaturabhängigkeit der Transferrate	16
2.3	Kohärente Effekte	22
3	Isomerisierung des Retinals in Bakteriorhodopsin des Bakteriums <i>Halobacterium salinarum</i>	26
3.1	Retinal gestützte Photosynthese: Bakteriorhodopsin aus <i>Halobacterium salinarum</i>	26
3.2	Isomerisierungsmodelle	32
3.2.1	Eindimensionale Modelle	33
3.2.2	Mehrdimensionale Modelle	36
3.2.2.1	Die konische Durchschneidung	36
3.2.2.2	Theoretische Anwendung auf retinalhaltige Moleküle	39
4	Meßaufbau	43
4.1	Ti:Saphirlaser-Oszillator und Verstärker	43
4.2	Nichtkollinearer optische parametrische Verstärker	47
4.3	Meßmethode: Anreg-Abtastspektroskopie	50
4.4	Meßaufbau für die Untersuchungen an Reaktionszentren	52
4.5	Meßaufbau für die Messungen an Bakteriorhodopsin	54

4.5.1	Meßaufbau	54
4.5.2	Kreuzkorrelationsmessungen	55
5	Femtosekundenspektroskopie an Reaktionszentren des Bakteriums	
	<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	61
5.1	Probenpräparation	61
5.2	Stationäre Spektren	62
5.3	Zeitaufgelöste Messungen am Wildtyp von <i>Rps. viridis</i>	65
5.3.1	Messungen im Bereich der stimulierten Emission von P*	66
5.3.1.1	Temperaturabhängigkeit	67
5.3.1.2	Wellenlängenabhängigkeit	69
5.3.2	Messungen der Temperaturabhängigkeit im Bereich der B-Bande	72
5.4	Zeitaufgelöste Messungen an der Mutante L168HF	75
5.4.1	Messungen im Bereich der stimulierten Emission von P*	77
5.4.1.1	Temperaturabhängigkeit	77
5.4.1.2	Wellenlängenabhängigkeit	79
5.4.2	Messungen im Bereich der B-Bande	79
5.5	Diskussion	82
5.5.1	Temperaturabhängigkeit	83
5.5.1.1	Der Zerfall des angeregten Zustands P*	83
5.5.1.2	Der Zerfall des Zustands P ⁺ B ⁻	87
5.5.2	Kohärente Effekte	88
5.5.3	Der Vergleich zwischen nichtadiabatischem und adiabatischem Elektrontransfer	91
5.5.4	Alternative Theorie zur Beschreibung der starken Beschleunigung der Reaktion bei tiefen Temperaturen	93
6	Femtosekundenspektroskopie an Bakteriorhodopsin	97
6.1	Probenpräparation	97
6.2	Meßergebnisse	99
6.2.1	Vorbemerkungen	101
6.2.2	Messung bei 480 nm im Bereich der excited-state-Absorption	101
6.2.3	Messungen im Bereich der Absorption der Intermediate J und K zwischen 620 und 730 nm	103
6.2.4	Messungen im Bereich der reinen stimulierten Emission	109
6.3	Diskussion	113
6.3.1	Reaktionsmodelle	113

6.3.2 Wellenpaketsbewegungen und Isomerisation	115
7 Zusammenfassung	120
Literaturverzeichnis	123
Danksagung	133

Kapitel 1

Einleitung

Die Nutzung des Sonnenlichtes als Energiequelle für das Leben auf der Erde war eine der bedeutendsten Entwicklungen im Laufe der Evolution. Die Photosynthese, das heißt die lichtgetriebene Erzeugung energiereicher chemischer Verbindungen, wird in der Natur auf zwei verschiedene Arten verwirklicht: in den Elektronentransferprozessen der chlorophyllhaltigen Bakterien, Algen und grünen Pflanzen und in der Protonenpumpe der retinalhaltigen Halobakterien [Ebe94]. Bei den in der Photosynthese ablaufenden Reaktionen unterscheidet man zwei Prozesse: die schnelle biophysikalische Lichtreaktion, die auf einer Zeitskala von Pikosekunden stattfindet, und die zur Entstehung eines Protonengradienten führt, der zur Bildung energiereicher Coenzyme, wie z.B. ATP und NADP, genutzt wird, und die nachfolgende biochemische Dunkelreaktion, die zur Synthese von biologischen Langzeitenergiespeichern, wie z.B. Zucker dient [Str88]. Während die Dunkelreaktion schon seit 1960 geklärt ist [Law90], wurde die Erforschung der Lichtreaktion erst durch die Entwicklung von Lasersystemen mit einer Zeitauflösung im Femtosekundenbereich möglich. Bereits in den achtziger Jahren konnten wichtige Fragen zur Lichtreaktion sowohl in der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin, als auch in den bakteriochlorophyllhaltigen Bakterien *Rhodospseudomonas viridis* und *Rhodobacter sphaeroides* geklärt werden. In beiden Systemen wird ein Chromophor (entweder ein Bakteriochlorophyll oder das Retinal) durch Absorption eines Photons angeregt. Durch nachfolgende Ladungstransferprozesse wird ein elektrochemisches Potential über die Zellmembran aufgebaut. Dieses wird dann zur Bildung obengenannter Coenzyme genützt. Die Untersuchung der ersten Energiekonversionsprozesse in Reaktionszentren des Bakteriums *Rhodospseudomonas viridis* und in Bakteriorhodopsin, der Protonenpumpe des Bakteriums *Halobacterium salinarium* ist schon seit einigen Jahren Gegenstand aktueller Forschung. Inzwischen führt die Verbesserung der Zeitauflösung der Femtosekundenexperimen-

te von anfangs einigen 100 fs bis in den 10 fs-Bereich heutzutage zu immer neuen Ergebnissen, wie z.B. der Beobachtung von Wellenpaketsbewegungen. Es ergeben sich daher neue Fragestellungen, wie:

- Koppelt die Wellenpaketsbewegung an die photochemische Reaktion?
- Wie schnell kann Elektronentransfer in biologischen Molekülen werden?
- Wo liegt die Grenze zwischen nichtadiabatischem und adiabatischem Elektronentransfer?

Diese Fragestellungen werden anhand der ersten Elektronentransferschritte in Reaktionszentren des photosynthetischen Bakteriums *Rps. viridis* und der Isomerisierung des Retinals im Protein Bakteriorhodopsin untersucht.

Kapitel 2

Elektronentransfer in Reaktionszentren des Bakteriums *Rhodopseudomonas viridis*

Im folgenden Kapitel werden zuerst der Aufbau und die Ladungstrennungsprozesse des bakteriellen Reaktionszentrums von *Rps. viridis* kurz beschrieben. Der zweite Teil des Kapitels dient der Einführung in die Elektronentransfertheorie, die zum Verständnis der Meßergebnisse benötigt wird.

2.1 Das bakterielle Reaktionszentrum von *Rps. viridis*

Die entscheidenden Ladungstransferprozesse der Photosynthese laufen in chlorophyllhaltigen Bakterien und in Pflanzen in den sogenannten Reaktionszentren ab (RC, engl.: reaction centre). RC sind Membranproteine, in die Farbstoffe (Chromophore) eingelagert sind. Das Reaktionszentrum ist in die intracytoplasmatische Membran, die das Periplasma von Cytoplasma trennt, eingebunden. Es wird im Allgemeinen von zwei Antennenkomplexen LHI und LHII (LH, engl.: light harvesting complex) umgeben, die größere Mengen von Bakteriochlorophyllen und Carotinoiden enthalten [McD95]. Sie absorbieren Sonnenlicht und leiten dessen Energie an das Reaktionszentrum weiter. Das hier untersuchte Bakterium *Rhodopseudomonas viridis* (*Rps. viridis*) besitzt nur einen Antennenkomplex, der ringförmig angeordnet ca. 25 Bakteriochlorophyll-b Moleküle enthält [Zub86] (siehe Abbildung 2.1). Die Absorption der Antennen von *Rps. viridis* liegt extrem langwellig im nahen In-

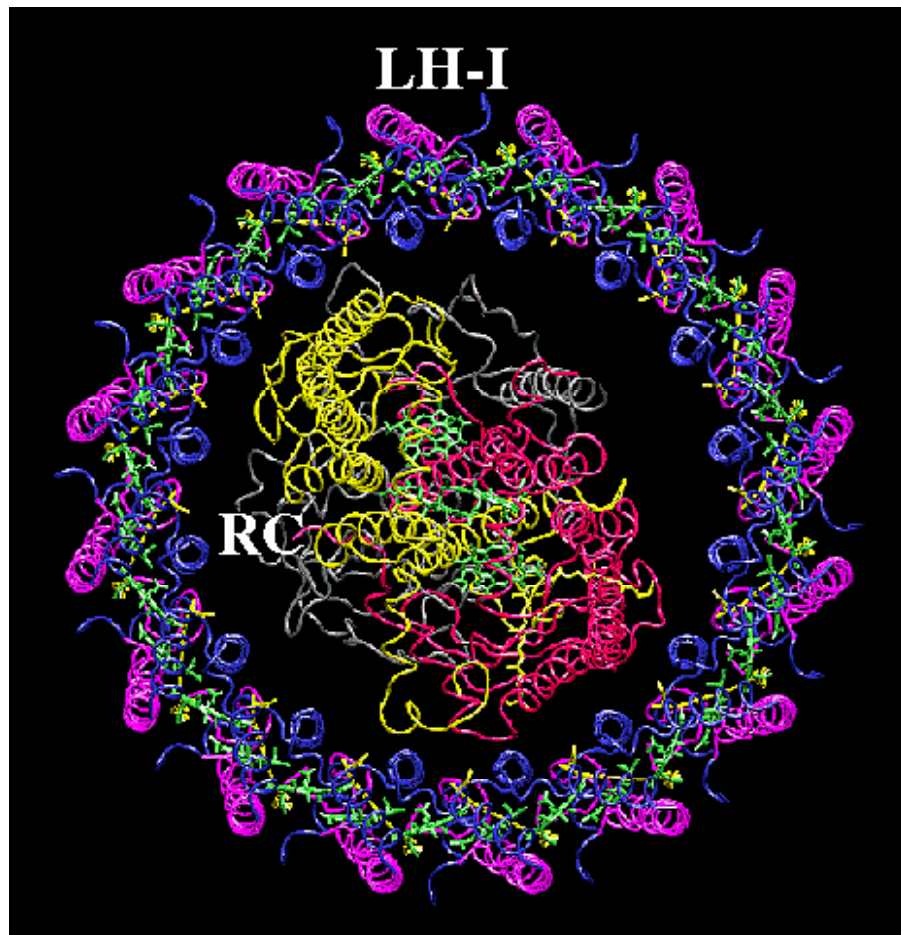
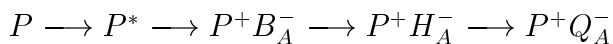


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Reaktionszentrums und der umgebenden Antennenmoleküle (Blick von oben auf die Membran).

frarot im spektralen Fenster zwischen zwei Wasserabsorptionsbanden (960 nm und 1180 nm) bei 1020 nm [Kle92]. Da das Special Pair (P), das den Ausgangspunkt für den Elektronentransport darstellt [Nor71, Feh75], mit einem Absorptionsmaximum von 965 nm energetisch höher liegt, kann die Energieübertragung von den Antennen auf das Special Pair nur thermisch aktiviert erfolgen. Die damit einhergehenden Verluste werden aber dadurch kompensiert, daß die Antennenkomplexe anderer Bakterien wesentlich kurzwelliger absorbieren [McD95, Hun89], und *Rps. viridis* so eine spektrale ökologische Nische ausnutzen kann.

Während Pflanzen und Algen mit zwei verschiedenen Photosystemen ausgestattet sind (Photosystem I und Photosystem II), besitzen Purpurbakterien, nur ein Photosystem, das sehr ähnlich aufgebaut ist, wie das Photosystem II der Pflanzen. Da-

her bietet es sich an, bakterielle Reaktionszentren als Modellsysteme zu verwenden. Ein weiterer Vorteil ist die größere Stabilität der bakteriellen Reaktionszentren und die Tatsache, daß ihre Struktur durch Röntgenstrukturanalyse schon seit 1984 geklärt ist [Dei89]. Das Reaktionszentrum selbst besteht aus einem Proteingerüst, aufgebaut aus drei Polypeptiduntereinheiten L, M und H und einer Cytochromuntereinheit und eingelagerten Chromophoren: einem Bakteriochlorophylldimer (dem Special Pair), zwei Bakteriochlorophyllmonomeren, zwei Bakteriopheophytinen und zwei Chinonen. Während die Chromophore als Lichtabsorber und Ladungsträger für den Ladungstransfer durch die Zellmembran zuständig sind, ist der Einfluß des Proteingerüsts auf die Ladungstrennung des Reaktionszentrums im Detail noch nicht geklärt. Die Hauptaufgaben bestehen offensichtlich darin, die Chromophore in einer für den Elektronentransfer günstigen Anordnung zu halten und andererseits durch entsprechende Polaritäten die energetische Lage der Transferzwischenprodukte derart zu beeinflussen, daß eine möglichst effektive Ladungstrennung durchgeführt werden kann [Arl96a]. Abbildung 2.2 zeigt schematisch die Anordnung der Chromophore eines Reaktionszentrums von *Rps. viridis* mit einigen ausgewählten Aminosäuren aus den Polypeptiduntereinheiten L und M des Proteingerüsts. Der Photosynthesesyklus beginnt mit der Absorption eines Photons durch die Antennenkomplexe. Die Energie des Photons wird an das Special Pair, ein Dimer bestehend aus zwei excitonisch gekoppelten Bakteriochlorophyllmolekülen (P_A und P_B) übertragen, wobei dieses in den ersten elektronisch angeregten Singulettzustand P^* übergeht. Von P^* wird das Elektron in ca. 2.2 ps auf das Bakteriochlorophyllmonomer des aktiven Ast, bezeichnet mit B_A , übertragen [Hol90, Arl93, vS97, Dre91b]. Da es aber von dort in einer sehr kurzen Zeit ($\tau = 0.65$ ps) [Arl93] zum Bakteriopheophytin H_A gelangt, ist der Zustand B_A im Wildtyp nur schwach (bis zu maximal 13 %) besetzt [Arl96a]. Von H_A gelangt das Elektron in einer Zeit von ca. 220 ps zum Chinon Q_A und von dort mit etwa 200 μ s zum Ubichinon Q_B [Mat92]. Für unsere Femtosekundenexperimente kann dieser Schritt schon als unendlich lange betrachtet werden. Zusammengefaßt stellt sich der ganze Elektronentransferzyklus wie folgt dar:



Details über den weiteren Ablauf des Photosynthesesyklus kann in [Dre86] nachgelesen werden. Die Quantenausbeute des gesamten Elektronentransferprozesses beträgt für *Rps. viridis* 97 % [Tri90]; auch die Energieausbeute der Ladungstrennung zwischen P^* und $P^+ Q_A^-$ ist mit 50-60 % noch hoch [Shu93].

In Abbildung 2.3 sind die Absorptionsbanden der einzelnen Chromophore im sichtbaren und nahinfraroten Spektralbereich zu sehen. Eine genauere Diskussion

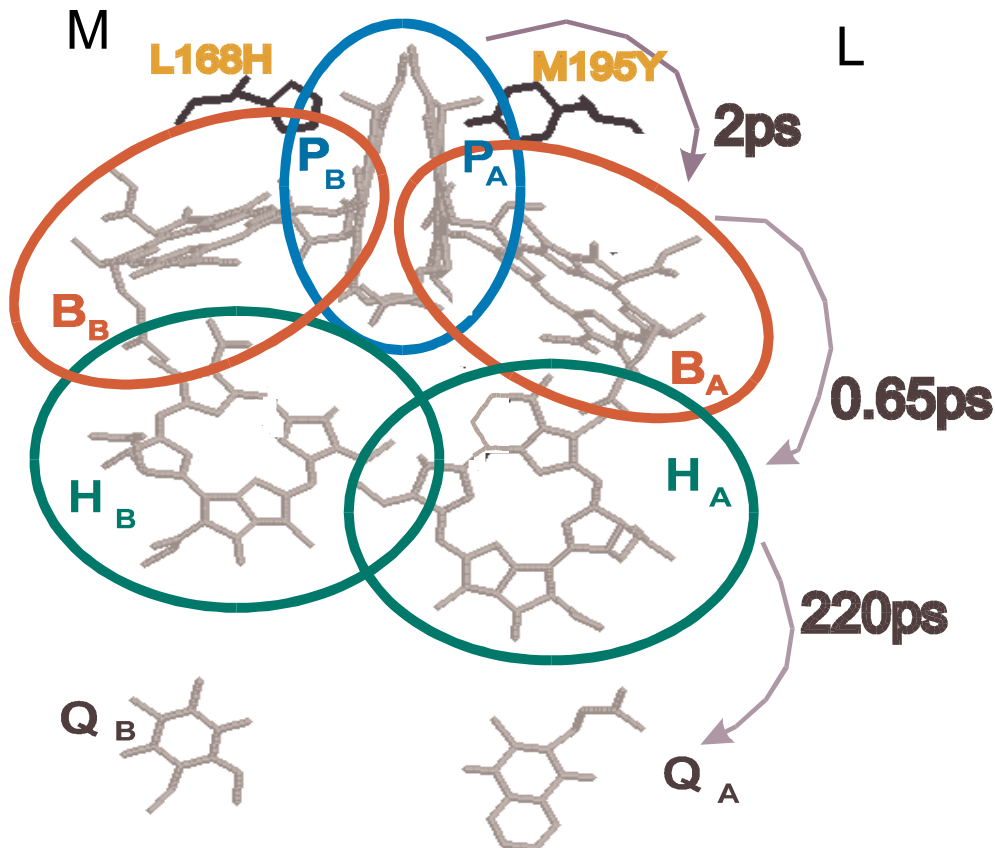


Abbildung 2.2: Schnitt durch die Zellmembran mit Darstellung der Anordnung der Pigmente, und den Aminosäuren L168HF und M195YF des Proteingerüsts. Die Pfeile kennzeichnen den Elektronentransferzyklus des RCs von *Rps. viridis*.

der Spektren findet man in [Dre91a] und [Hol89]. Für die Femtosekundenmessungen wurden die Reaktionszentren im Maximum der P-Bande bei 960 nm angeregt (Abbildung 2.3). Die Zerfallszeiten der Zustände P^* und P^+B^- wurden entweder im Bereich der stimulierten Emission von P^* zwischen 1020 nm und 1100 nm gemessen oder als transiente Absorption im Bereich der Absorptionsbande des Bakteriochlorophyllmonomers B_A bei ca. 820 nm (siehe Kapitel 5). Die Zerfallszeiten der anderen Zustände sind deutlich länger. Sie konnten daher früher ausreichend genau bestimmt werden und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Um die Rolle des Proteingerüsts auf die Funktion der Reaktionszentren besser zu verstehen, wurden vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried spezifisch mutierte Reaktionszentren konstruiert. Bei diesen Reaktionszentren wurden

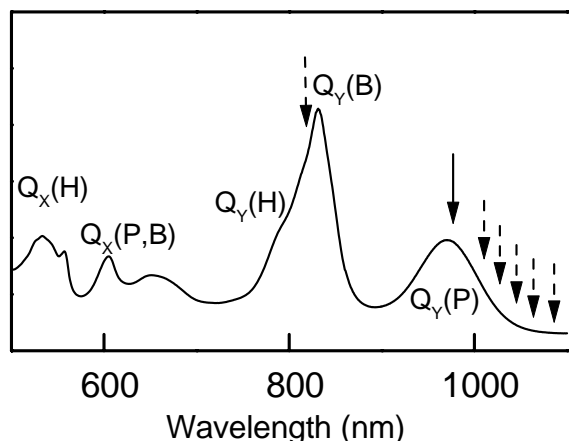


Abbildung 2.3: Absorptionsspektrum des Reaktionszentrums von *Rps. viridis*, der durchgezogene Pfeil zeigt die Anregungswellenlänge, die gestrichelten Pfeile die verschiedenen Abtastwellenlängen.

einzelne Aminosäuren des Proteingerüsts gegen andere ausgetauscht. Somit konnten z.B. gezielt Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Proteingerüst und Chromophoren geändert werden, oder auch Asymmetrien der L- und M-Proteinuntereinheit entfernt werden. Eine genauere Beschreibung der Herstellung genetisch modifizierter Reaktionszentren findet sich in [Arl96c, Sch94]. In dieser Arbeit wurde die Mutante L168HF im Detail untersucht, bei der an der Stelle L168 (L bezeichnet die Proteinuntereinheit, 168 die Position) das Histidin (H) gegen ein Phenylalanin (F) ausgetauscht [Erm94] und damit eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Special Pair und dem L-Ast des Proteingerüsts entfernt wurde. Diese Mutante erwies sich als besonders interessant, da durch die Entfernung der Wasserstoffbrückenbindung sowohl die excitonische Kopplung zwischen den Bakteriochlorophyllen, die das Dimer bilden, als auch die Kopplung zwischen Special Pair und dem Bakteriochlorophyllmonomer B_A stark verändert wird. Schon frühere Raumtemperaturmessungen konnten zeigen, daß diese Mutation den Elektronentransfer von P^* nach B_A von 2.2 ps (Wildtyp) auf 0.8 ps (Mutante L168HF) stark beschleunigt [Arl96b, Pen95]. Da der zweite Elektronentransferschritt durch diese Mutation nicht beeinflusst ist, wurde die maximale Besetzungsdichte des Zustandes $P^+B_A^-$ daher von 13 % (Wildtyp) auf 30 % (Mutante L168HF) vergrößert und konnte damit eindeutig nachgewiesen werden [Pen95]. Durch Tieftemperaturmessungen an dieser Mutante sollte der ultraschnelle Elektronentransfer in Reaktionszentren (siehe Kapitel 2.2) näher

untersucht werden, und so eine mögliche Kopplung zwischen Elektronentransfer und Schwingungsbewegung gefunden werden.

2.2 Elektronentransfertheorie

Die Elektronentransfertheorie liefert ein Modell zur Berechnung der Elektronentransferrate zwischen Ausgangs- und Endzustand in Abhängigkeit von verschiedenen Systemparametern. Mitte des letzten Jahrhunderts gelang es R. Marcus 1956 eine klassische Theorie des Elektronentransfers in polaren Lösungsmitteln zu entwickeln, für die er 1992 den Nobelpreis für Chemie erhielt [Mar93]. Diese Theorie kann auf den Elektronentransfer in biologischen Systemen übertragen werden, wenn man annimmt, daß die mehr oder weniger polare Umgebung in diesem Fall aus einem Proteingerüst besteht. Da die von Marcus entwickelte Theorie nur für den klassischen Grenzfall gilt, wurde sie von Hopfield, der eine semiklassische Beschreibung einführte, erweitert [Hop76]. Eine vollständige quantenmechanische Beschreibung lieferten Jortner und Mitarbeiter [Jor76].

2.2.1 Voraussetzungen

Im Rahmen der Elektronentransfertheorien betrachtet man ein System bestehend aus einem Elektronendonator D, einem Elektronenakzeptor A und dem umgebenden Medium. Beim Reaktionszentrum ist das Medium das Proteingerüst. Die potentielle Energie des Ausgangszustandes DA und des Endzustandes D^+A^- ist eine Funktion von vielen Koordinaten, z.B. den Ortskoordinaten der Atome, den Orientierungskoordinaten der Lösungsmittelatome und den Schwingungskoordinaten. Diese Koordinaten werden in einer einzigen effektiven Reaktionskoordinate q zusammengefaßt. Trägt man die Energie von Anfangs- und Endzustand gegen diese verallgemeinerte Kernkoordinate auf, so erhält man in der einfachsten eindimensionalen Näherung zwei Parabeln, mit ihren Minima in der Gleichgewichtslage des jeweiligen Zustandes (siehe Abbildung 2.4). Da sich beim Elektronentransfer die Orts- und Impulskoordinaten der Kerne nicht ändern (Energie- und Impulserhaltung, Franck-Condon-Prinzip), kann der Elektronentransfer nur am oder in der Nähe des Schnittpunktes der beiden Potentialparabeln stattfinden.

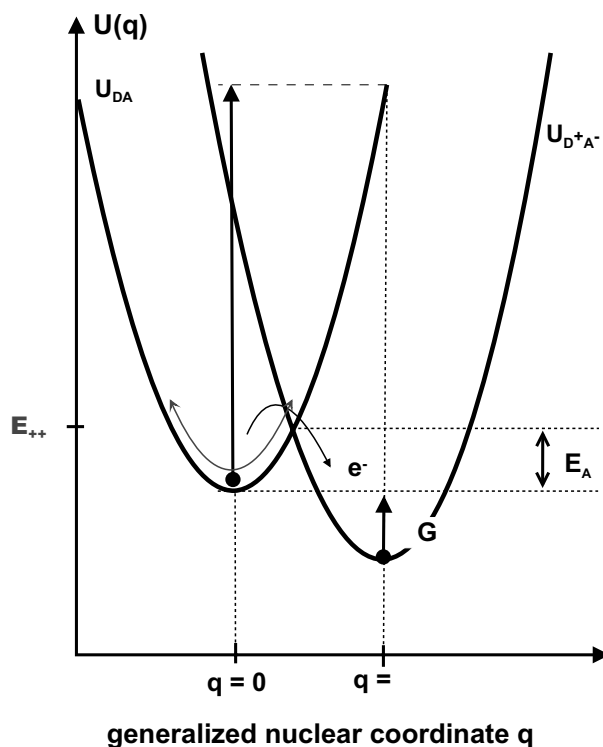


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Potentialflächen des nichtadiabatischen Elektronentransfers für Donor und Akzeptor: ΔG : Gibbs'sche freie Energiedifferenz, λ : Reorganisationsenergie, E_A : Aktivierungsenergie, E_{++} : Energie am Kreuzungspunkt.

Abbildung 2.4 zeigt die für den Elektronentransfer wichtigen Systemparameter: ΔG ist die Differenz der freien Energien der jeweiligen Gleichgewichtslagen, λ die Reorganisationsenergie, d.h., die Energie, die im Ausgangszustand aufgewendet werden muß, um die Gleichgewichtslage des Endzustands zu erreichen. Die Größe der Reorganisationsenergie hängt kritisch von Eigenschaften der Umgebung (z.B. Beweglichkeit des Proteingerüsts) ab. E_A ist die Aktivierungsenergie, d.h. die Energiedifferenz zwischen dem Schnittpunkt der Potentialflächen und der Gleichgewichtsenergie des Ausgangszustandes. Zwischen der Aktivierungsenergie, der Reorganisationsenergie und ΔG ergibt sich folgender Zusammenhang¹:

$$E_A = \frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda} \quad (2.1)$$

Außerdem sind noch zwei weitere Systemparameter von Bedeutung, nämlich die elektronische Kopplung zwischen Ausgangs- und Endzustand (V) und die mittlere Frequenz der Schwingungsmode ω .

¹Diese Beziehung gilt nur, wenn die Schwingungsmode ω für beide Parabeln gleich ist

Des Weiteren werden verschiedene Näherungen zur Berechnung der Elektronentransferrate benötigt:

- Born-Oppenheimer-Näherung: Da die Elektronen eine wesentlich kleinere Masse als die Kerne besitzen, geht man davon aus, daß die Elektronen der Kernbewegung instantan folgen, und die Gesamtwellenfunktion somit in ein Produkt aus Kernwellenfunktion und Elektronenwellenfunktion separiert werden kann.
- Harmonische Näherung: Die Bewegung der Kerne findet in harmonischen Potentialen statt, d.h. die Potentialflächen U_{DA} und U_{D+A-} werden durch harmonische Potentiale der gleichen Schwingungsfrequenz ω genähert. Dies entspricht der Ersetzung aller an den Elektronentransfer koppelnden Schwingungsmoden durch eine effektive Mode ω (Single-Mode-Näherung)

2.2.2 Fälle und Unterscheidungskriterien

Ein erster Ansatz zur klassischen Berechnung der Elektronentransferrate ging von folgender Situation aus (siehe Abbildung 2.4): Stellt man sich ein oszillierendes System mit der Schwingungsenergie E im Ausgangszustand vor, dessen Schwingungsenergie über dem Kreuzungspunkt E_{++} der beiden Parabeln liegt, so passiert das Elektron den Kreuzungspunkt zweimal pro Schwingungszyklus. Jedesmal wenn der Kreuzungspunkt passiert wird, kann das Elektron mit einer Wahrscheinlichkeit P_{ab} auf die Potentialparabel des Endzustandes gelangen. Die mikroskopische Rate bei einer bestimmten Ausgangsenergie E berechnet sich daher zu:

$$k(E) = 2P_{ab} \frac{\omega}{2\pi} \quad (2.2)$$

Um die vollständige makroskopische Rate zu erhalten, muß noch über die Boltzmannverteilung der Energien gemittelt werden:

$$k = \frac{\int_{E_{++}}^{\infty} k(E) e^{-E/k_B T} dE}{\int_0^{\infty} e^{-E/k_B T} dE} \quad (2.3)$$

Diese Formel ist im klassischen Fall sowohl für nichtadiabatischen als auch für adiabatischen Elektronentransfer gültig. Im Folgenden werden zuerst verschiedene Methoden zur Berechnung der nichtadiabatischen Elektronentransferrate vorgestellt, im Weiteren wird eine verallgemeinerte Theorie, die auch für den adiabatischen Fall gilt, angegeben.

2.2.2.1 Nichtadiabatischer Fall

Voraussetzung für den nichtadiabatischen Elektronentransfer ist, daß sich die Besetzung der Energieniveaus im Ausgangszustand im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebung befindet. Nach der Anregung durch einen Lichtimpuls in die Franck-Condon-Region muß das System genug Zeit haben, um in den Gleichgewichtszustand zu relaxieren, bevor der Elektronentransfer stattfindet. Eine Abschätzung der Schwingungsrelaxation im angeregten Ausgangszustand liefert die Phasenrelaxationszeit. Die in unseren Messungen verwendeten kurzen, spektral breiten Pulse präparieren im Ausgangszustand ein kohärentes Wellenpaket. Dessen Kohärenz kann durch elastische (reine Phasenrelaxation T_{RP}) und inelastische Prozesse (Energierelaxation T_1) zerstört werden. Die resultierende Dephasierung, mit der die Kohärenz der Zustände verschwindet (Phasenrelaxationszeit T_2) ist die Summe der beiden Wechselwirkungsbeiträge: $1/T_2 = 1/T_{RP} + 1/2T_1$. Zur Beurteilung der Thermalisierung des Ausgangszustand ist die Energierelaxationszeit der entscheidende Faktor, allerdings ist T_1 nicht direkt meßbar. Aus den Messungen der Phasenrelaxationszeit T_2 kann jedoch eine untere Grenze für die Energierelaxation T_1 abgeschätzt werden ($T_2 \leq 2T_1$). Für das Reaktionszentrum wurden in Lochbrennexperimenten Phasenrelaxationszeiten von 100 fs -300 fs bestimmt [Tan90, Sma95], zeitaufgelöste Infrarotmessungen ergaben Zeiten von ungefähr 600 fs [Ham94]. Aus diesen Messungen ergibt sich für die Energierelaxation $T_1 \geq 100$ -600 fs. Da die schnellsten beobachteten Transferzeiten des ersten Elektronentransferschrittes bei Raumtemperatur bei etwa 2 ps liegen, ist für die Anpassung der Raumtemperaturdaten die nichtadiabatische Theorie ausreichend. Für die Anpassung der Tieftemperaturdaten, wo Zerfallszeiten bis zu 200 fs gemessen wurden, muss die adiabatische Beschreibung berücksichtigt werden (s.u.).

Berechnet man die Übergangswahrscheinlichkeit P_{ab} am Kreuzungspunkt der beiden Parabeln für ein in Abbildung 2.4 dargestelltes System klassisch, und setzt man das Ergebnis in Gleichung 2.3 ein, so erhält man in der nichtadiabatischen Näherung die klassische Marcusrelation [DeV84]:

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} V^2 \frac{e^{-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}}}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \quad (2.4)$$

Für eine vollständige quantenmechanische Berechnung der Elektronentransferreaktion muß die makroskopische Rate mithilfe der Störungstheorie berechnet werden. Man erhält Fermi's Goldene Regel:

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} V^2 FC \quad (2.5)$$

wobei V die elektronische Kopplung der beiden Zustände und FC (Franck-Condon-Faktor) den Überlapp der Kernwellenfunktionen angibt. Unter der Voraussetzung der Born-Oppenheimer-Näherung kann der Überlapp der Kernwellenfunktionen analytisch berechnet werden. Man erhält nach [Jor76] für den Franck-Condon-Faktor folgenden Ausdruck:

$$FC = \frac{1}{\hbar\omega} e^{-S(2\nu+1)} I_p(2S\sqrt{\nu(\nu+1)}) \left(\frac{\nu+1}{\nu}\right)^{\frac{p}{2}} \quad (2.6)$$

mit $S = \frac{\Delta^2}{2}$, $p = \frac{\Delta G}{\hbar\omega}$, $\nu = \frac{1}{e^{\frac{\hbar\omega}{k_B T}} - 1}$

I_p : modifizierte Besselfunktion der Ordnung p

ω : Frequenz des harmonischen Oszillators

ν : mittlere Schwingungsquantenzahl des harmonischen Oszillators

p : normierte Differenz der freien Energien

S : normierte Reorganisationsenergie

ΔG : der horizontale Abstand der Potentialminima von DA nach D^+A^- (entsprechend Abbildung 2.4)

Δ : der vertikale Abstand der Parabelminima

Ausgehend von Gleichung 2.6 können zwei Grenzfälle betrachtet werden:

i) Tieftemperaturlimit: $k_B T \ll \hbar\omega$

$$FC_{TT} = \frac{1}{\hbar\omega} e^{-S} \frac{S^p}{p!}$$

Wenn die thermische Energie klein gegenüber der Schwingungsenergie $\hbar\omega$ ist, liegt das System nur noch im untersten Schwingungszustand vor. Der Franck-Condon-Faktor wird temperaturunabhängig.

ii) Hochtemperaturlimes $k_B T \gg \hbar\omega$

$$FC_{HT} = \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} e^{-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}}$$

Im Hochtemperaturlimes geht die quantenmechanische Berechnung von Jortner in die oben hergeleitete klassische Marcusrelation über. Nach Jortner [Jor80] liegt der Übergang zwischen den beiden Fällen bei etwa $k_B T = \hbar\omega/4$. Die einfachste Möglichkeit die Temperaturabhängigkeit bei tiefen und hohen Temperaturen gleichzeitig zu behandeln, stellt die semiklassische Beschreibung von Hopfield dar. Um die Temperaturabhängigkeit bei hohen Temperaturen und die Temperaturunabhängigkeit bei tiefen Temperaturen zu erklären, müssen die Oszillatoren quantenmechanisch behandelt werden. Während im klassischen Fall die Oszillationen im thermischen

Gleichgewicht einer Boltzmannverteilung mit der Temperatur T unterliegen, berücksichtigt die quantenmechanische Behandlung die Tatsache, daß die Energieniveaus mit dem Abstand $\hbar\omega$ und einem niedrigsten Niveau bei $\hbar\omega/2$ quantisiert sind. Für die durchschnittliche Energie erhält man dann:

$$E = \frac{\hbar\omega}{2} \coth\left(\frac{\hbar\omega}{2k_B T}\right)$$

Für hohe Temperaturen ($k_B T \gg \hbar\omega/2$) geht die Durchschnittsenergie in $E=k_B T$ über, so daß man wieder die Marcusrelation 2.4 erhält, während man im Tieftemperaturlimit ($k_B T \ll \hbar\omega/2$) die temperaturunabhängige Grundzustandsenergie $\hbar\omega/2$ erhält. Der vollständige semiklassische Ausdruck für den Franck-Condon-Faktor ergibt sich dann nach Hopfield zu:

$$FC = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.7)$$

mit

$$\sigma^2 = \lambda \hbar\omega \coth\left(\frac{\hbar\omega}{2k_B T}\right)$$

Für den nichtaktivierten Fall ($-\Delta G = \lambda$) vereinfacht sich die Formel für den Franck-Condon-Faktor zu:

$$FC = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \quad (2.8)$$

Genauere Berechnungen der hier vorgestellten Modelle, sowie ein Vergleich der quantenmechanischen Theorie von Jortner mit der semiklassischen Theorie von Hopfield anhand von Tieftemperaturmessungen am Bakterium *Chromatium vinosum* finden sich in [DeV84].

2.2.2.2 Adiabatischer Fall

Zur Unterscheidung zwischen nichtadiabatischem und adiabatischem Elektronentransfer können unterschiedliche Kriterien herangezogen werden. Eine rein mathematische Definition spricht von adiabatischem Elektronentransfer sobald der Landau-Zener-Faktor γ_{LZ} (s.u.) größer oder gleich eins wird. Ein anderes anschauliches Unterscheidungsmerkmal ist, ob der Elektronentransfer von einem relaxierten Schwingungszustand ausgeht (nichtadiabatischer Elektronentransfer), oder ob der Elektronentransfer schneller als die Schwingungsrelaxation ist, also von einem angeregten Schwingungsniveau aus erfolgt. Ein Grund für schnellen Elektronentransfer ist eine starke elektronische Kopplung V zwischen Donor und Akzeptor. Im Bild zweier Potentialparabeln wird die starke Kopplung und die damit verbundene höhere Übergangswahrscheinlichkeit durch eine Aufspaltung am Kreuzungspunkt zwischen den

beiden Parabeln verdeutlicht (siehe Abbildung 2.5). Je größer die Kopplung ist, desto größer ist die Aufspaltung von Edukt- und Produktparabel, desto größer ist also auch die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang in den Produktzustand. Eine adiabatische Reaktion ist also ein Vorgang, der auf einer einzigen adiabatischen Potentialfläche abläuft [Tur79]. Falls das Elektron vom Produktzustand aus nicht

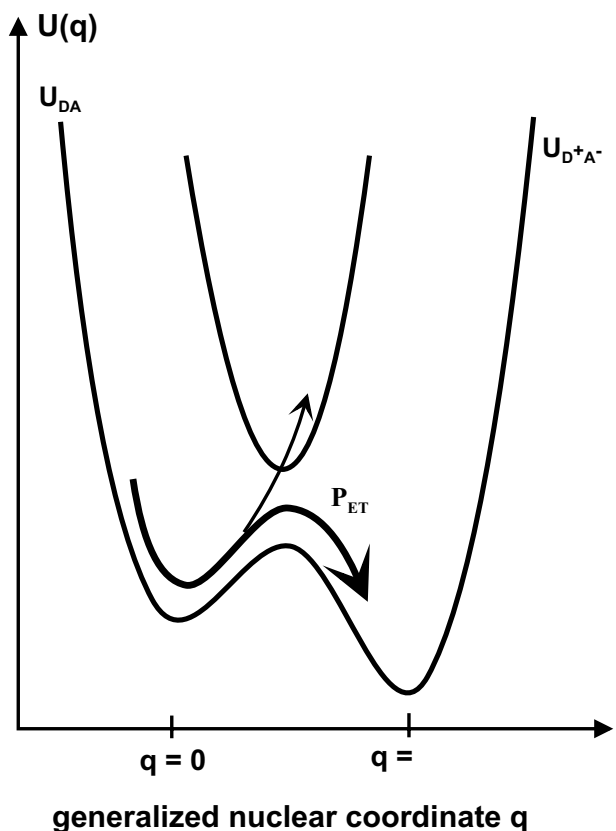


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Potentialflächen des adiabatischen Elektronentransfers für Donor und Akzeptor. Die Elektronentransferwahrscheinlichkeit P_{ET} ist für einen Übergang in den Produktzustand U_{D+A^-} groß.

in einen weiteren Zustand transferiert wird, oszilliert es in den Ausgangszustand zurück, da die Kopplung in diese Richtung genauso stark ist. Die für diesen Fall zu beobachtende Oszillationsfrequenz wäre etwa halb so groß, wie im nichtadiabatischen Fall kleiner Kopplung. Allerdings wäre dann trotz großer Kopplung die Effektivität des Elektronentransfers zwischen Donor und Akzeptor nicht zwangsläufig optimal. Effektiver Elektronentransfer könnte ermöglicht werden, wenn das Elektron in einen weiteren Zustand gelangt, bevor es in den Ausgangszustand zurückkehrt, und so dem

System eine Irreversibilität aufgeprägt wird. Dies könnte z.B. dadurch ermöglicht werden, daß sich die Kernkonfiguration beim Erreichen des ersten Akzeptorzustandes ändert, so daß die Kopplung zwischen Donor- und erstem Akzeptorzustand verkleinert, und die Rückreaktion vermieden wird. Während im rein adiabatischen Fall die Rate durch

$$k = \frac{\omega}{2\pi} e^{-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}} \quad (2.9)$$

gegeben ist [Bix98], benötigt man zur Anpassung der Meßdaten, die im Hochtemperaturfall nichtadiabatischen Transfer, bei tiefen Temperaturen jedoch vermutlich adiabatischen Transfer zeigen, eine allgemein gültige Theorie. Während bei der Ableitung der nichtadiabatischen Elektronentransfertheorie eine kleine Übergangswahrscheinlichkeiten $P_{ab} \ll 1$ (und somit $P_{ab} \approx \gamma_{LZ}$ (siehe Gleichung 2.11)) angenommen wurde, muß für den allgemeinen Fall in Gleichung 2.3 die komplette Beziehung zur Berechnung der Übergangswahrscheinlichkeit verwendet werden²:

$$P_{ab} = 1 - e^{-\gamma_{LZ}} \quad (2.10)$$

mit

$$\gamma_{LZ} = \frac{2\pi V^2}{\hbar\omega\sqrt{2\lambda k_B T}} \quad (2.11)$$

γ_{LZ} ist der Landau-Zener-Faktor, benannt nach Landau und Zener, die unabhängig voneinander in den 30er Jahren eine Theorie für die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei verschiedenen Zuständen eines Moleküls entwickelten (1932 berechnet C. Zener die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen einem polaren und einem homopolaren Eigenzustand eines Moleküls im eindimensionalen Fall [Zen32]). Setzt man diese allgemein gültige Beziehung in Gleichung 2.2 ein, kann das Integral nur noch numerisch gelöst werden. Es zeigt sich im Vergleich zur nichtadiabatischen Näherung im Wesentlichen eine Verlängerung der Reaktionszeit um eine halbe Schwingungsperiode. Abbildung 2.6 zeigt den Vergleich zwischen nichtadiabatischer und allgemein gültiger Datenanpassung bei gleicher Parameterwahl. Wie zu erwarten, wird der Unterschied bei langsameren Elektronentransferzeiten kleiner, da eine Verschiebung um eine halbe Schwingungsperiode (Größenordnung einige 100 fs) bei Zeiten in der Größenordnung von einer Pikosekunde nicht mehr ins Gewicht fällt.

Da der Landau-Zener-Faktor einen direkten Zusammenhang zwischen Übergangswahrscheinlichkeit, elektronischer Kopplung und anderen für den Transfer relevanten Parametern herstellt, wird er als Unterscheidungskriterium zwischen nichtadiabatischem und adiabatischem Elektronentransfer benutzt:

²Die Energieniveaus wurden gemäß der semiklassischen Näherung als quantisiert angenommen.

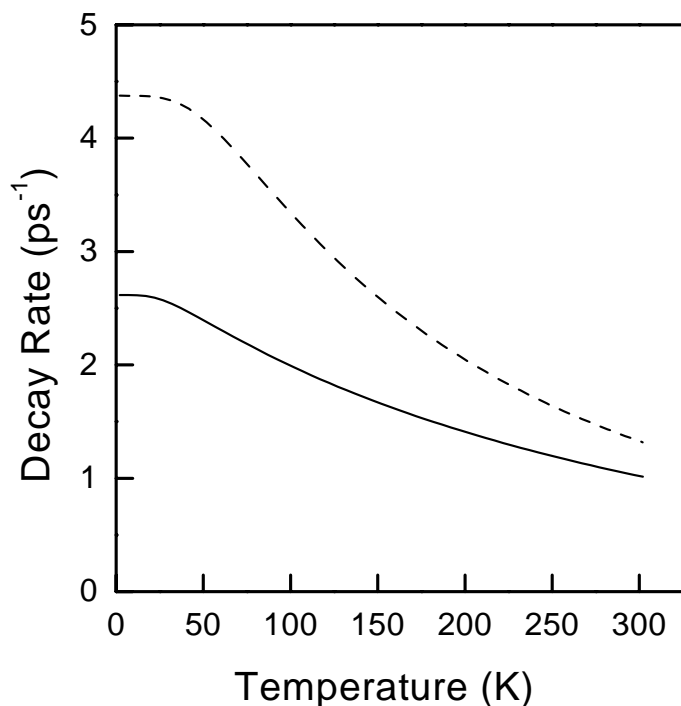


Abbildung 2.6: Vergleich zwischen nichtadiabatischer (gestrichelte Linie) und allgemeiner Formel (durchgezogene Linie); die Berechnung erfolgte für den aktivierungslosen Fall $E_A = 0 \text{ cm}^{-1}$, mit einer Kopplung $V = 36 \text{ cm}^{-1}$, einer Reorganisationsenergie $\lambda = 450 \text{ cm}^{-1}$ und $\hbar\omega = 60 \text{ cm}^{-1}$.

ist der Landau-Zener-Faktor ≥ 1 , so ist der Transfer adiabatisch, andernfalls nichtadiabatisch. Da die elektronische Kopplung V quadratisch in die Berechnung des Landau-Zener-Faktors und in die Elektronentransferrate eingeht, ist ihre Größe ein entscheidendes Maß für die Adiabaticität des Prozesses.

2.2.3 Temperaturabhängigkeit der Transferrate

In den meisten älteren Theorien sind die Systemparameter temperaturunabhängig, und die Temperaturabhängigkeit der Rate geht allein von der mittleren Schwingungsquantenzahl des Franck-Condon-Faktors aus. Die Veränderung des Franck-Condon-Faktors mit der Temperatur ist eine Folge der Thermalisierung des Ausgangszustandes und der damit verbundenen temperaturabhängigen Besetzung der Niveaus innerhalb des harmonischen Oszillators. Temperaturabhängige Messungen der letzten Jahre zeigten allerdings, daß diese Abhängigkeit nicht ausreicht, um die Daten zu beschreiben. Diskutiert werden deshalb unterschiedliche Lösungsvorschläge:

- i) temperaturabhängiges ΔG :

Peloquin et al. schlugen vor, die Temperaturabhängigkeit der ersten Elektronentransferschritte an Reaktionszentren des Wildtyps und einer Mutante von *Rhodobacter sphaeroides* durch Variation der freien Energie ΔG mit der Temperatur [Pel94] zu erklären. Zur erfolgreichen Anpassung der temperaturabhängigen Fluoreszenzmessungen benötigten sie vor allem bei längeren Zeiten unverhältnismäßig große Änderungen von ΔG (bis zu 1250 cm^{-1}). Nachdem Mutationen am Special Pair, die die Elektronentransferzeit um ein mehrfaches beschleunigten (L168HF) oder verlangsamteten (M208YF) [Arl00, Pen95] nur eine Änderung von ΔG um -650 cm^{-1} , bzw. um $+120 \text{ cm}^{-1}$ bewirkten, ist es unrealistisch für die Anpassung der Temperaturabhängigkeit eine wesentlich größere Änderung von ΔG anzunehmen. Rechnungen zu Untersuchungen des P^+ -Zustandes zeigten außerdem ein temperaturunabhängiges ΔG [Gol88, Ogr88a, Tak88].

- ii) temperaturabhängiges λ :

Die Reorganisationsenergie λ ist ein Maß für die Beweglichkeit des Systems. Es ist also nicht von vornherein auszuschließen, daß sich die Beweglichkeit der Chromophore in den Reaktionszentren bei Variation der Temperatur ändert. Temperaturabhängige Messungen der Ladungsrekombination von $P^+Q_A^-$ nach PQ_A am Wildtyp und an Mutanten von *Rhodobacter sphaeroides* [Ort96, Fra93] zeigten, daß auch hier die Standardtheorie nicht ausreichte, die Daten anzupassen. Da der Unterschied der freien Energie ΔG relativ zum Wildtyp bekannt war, wurde die Transferrate von Wildtyp und Mutanten bei jeder gemessenen Temperatur gegen ΔG aufgetragen und mit der zwei-Moden-Näherung mit konstanten Werten für die Kopplung und die beteiligten Schwingungsmoden und variabler Reorganisationsenergie λ angepaßt (in der zwei-Moden-Näherung gilt: $\lambda = \lambda_M + \lambda_L$, wobei λ_M der mittleren Schwingungsmode, und λ_L der niederfrequenten Schwingungsmode entspricht). Die gesamte Reorganisationsenergie ändert sich hier von 7844 cm^{-1} bis auf 5203 cm^{-1} . Obwohl eine Verringerung der Reorganisationsenergie bei tiefen Temperaturen der Intuition entspricht, scheint diese Abhängigkeit doch etwas zu extrem, vor allem, wenn man berücksichtigt, daß die Temperaturabhängigkeit nur von der niederfrequenten Mode stammt, da die höherfrequente Mode temperaturunabhängig sein soll [Ort96]. Außerdem ist ein temperaturabhängiges λ und ein temperaturunabhängiges ΔG nur möglich, wenn sich die Form der Potentialflächen von Donor oder Akzeptor temperaturabhängig ändert.

- iii) temperaturabhängiges V:

Das elektronische Matrixelement V^2 ist die Summe von Coulomb- und Austauschintegral. Sein Betrag ist proportional zum räumlichen Überlapp der elektronischen Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor, der sich aus der geometrischen Lage der beteiligten Chromophore ergibt. Eine Vergrößerung des Abstandes zwischen Donor- und Akzeptormolekül verursacht in der Regel eine Abnahme der elektronischen Kopplung V^2 , also eine Verminderung des Überlapps der elektronischen Wellenfunktionen. Geht man in erster Näherung von zwei Potentialtöpfen getrennt durch eine Potentialbarriere der Dicke R aus, erhält man exponentielles Verhalten bei Veränderung des Abstandes [Mos92a, Mos92b]:

$$V^2 = V_0^2 \exp(-\beta R) \quad (2.12)$$

Der Exponentialkoeffizient β beschreibt, wie gut die elektronischen Wellenfunktionen das Medium zwischen den Potentialtöpfen durchdringen können. Für intraproteinären Elektrontransfer wurde der Wert für β zu 1.4 \AA^{-1} bestimmt [Mos92a, Mos92b].

Durch die Wärmeausdehnung ändert sich der Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül, und damit auch die elektronische Kopplung V . Erste Annahmen zur Beschreibung der Abstandsänderung bei Abkühlung von Proteinen beruhen auf einem Debyemodell, mit einer Debyetemperatur zwischen 160 K und 200 K. Die oberhalb der Debyetemperatur lineare Temperaturabhängigkeit beschreibt Gleichung

$$R(T) = R(T_0)(1 - \alpha_{Myo}\Delta T) \quad (2.13)$$

Der Koeffizient α_{Myo} wurde für Rindermyoglobin zu $140 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ abgeschätzt [Fra87]. Aktuelle Messungen an Myoglobin [Par98] zeigen allerdings, daß eine lineare Abstandsabhängigkeit in diesem Temperaturbereich eine zu große Vereinfachung darstellt. Eine Verbesserung wurde durch eine polynomiale Anpassung der Meßdaten erreicht.

$$R(T)/R(300K) = a + bT + cT^2 + dT^3 \quad (2.14)$$

mit $a = 0.99$, $b < 1\text{E-}12 \text{ K}^{-1}$, $c = 2.16\text{E-}9 \text{ K}^{-2}$, $d = 4.12\text{E-}10 \text{ K}^{-3}$

Da diese Messungen nur für Myoglobin vorliegen, und nicht für photosynthetische Reaktionszentren, wurde $R(T)$ noch mit einem Faktor α multipliziert, um Abweichungen zwischen Myoglobin und Reaktionszentren zu ermöglichen. Diese in erster Näherung lineare Temperaturabhängigkeit ist allerdings nur

bei größeren Abständen und kleiner Kopplung V eine sinnvolle Beschreibung. Im Falle von sehr kleinen Abständen zwischen Donor- und Akzeptormolekül müssen Interferenzerscheinungen bei der Berechnung des elektronischen Matrixelements berücksichtigt werden, die zum Beispiel auch dafür verantwortlich sein können, daß die Kopplung zwischen P und B_B deutlich kleiner als die Kopplung zwischen P und B_A ist [Zha98]. Diese Interferenzerscheinungen verhindern ein weiteres Anwachsen der Kopplung bei Abständen kleiner als ein kritischer Abstand R_k .

Temperaturabhängige Messungen an verschiedenen Elektronentransferprozessen (z.B. auch am Elektronentransfer von $P^+H_A^-$ nach $P^+Q_A^-$ und an der Rekombination $P^+Q_A^-$ nach PQ_A [Kuz98, McM98]) in photosynthetischen Reaktionszentren zeigten jedoch, daß die Temperaturabhängigkeit dieser Reaktionen mit der oben beschriebenen Theorie nicht angepaßt werden kann. Deshalb wurde von Kolbasov und Scherz eine alternative Theorie entwickelt, die sowohl die Temperaturabhängigkeit, als auch die hohe Effektivität des Elektronentransfers erklärt [Hup00]. Voraussetzungen dieser Theorie sind:

- a) es gibt verschiedene Konformationen der Chromophore
- b) ein kleiner Teil dieser Konformationen hat ein größeres elektronisches Übergangsmatrixelement V und
- c) diese für den Elektronentransfer günstigen Konformationen liegen energetisch niedriger, als die ungünstigeren Konformationen.

Berechnet man das Übergangsmatrixelement V für kleine Abstände, wie die zwischen P und B_A und zwischen B_A und H_A , so ergibt sich eine starke Änderung von V für kleine Translationen (bis zu 2 \AA) oder Rotationen (bis zu 10°) der Chromophore (siehe Abbildung 2.7). Wie man sieht, können schon kleine Abweichungen das Verhältnis der Kopplungen $(V/V_0)^2$, wobei V_0 der Kopplung ohne Translations- bzw. Rotationsänderung entspricht, drastisch ändern. Abweichungen von der in kristallisierter Form gewonnenen Struktur in diesen Größenordnungen sind durchaus realistisch. Ein Grund für die Stabilisierung einer stärker gekoppelten Konformation kann eine transiente Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung sein. In diesem Fall wäre diese Konformation für den Elektronentransfer energetisch begünstigt. Mit der Temperatur ändert sich auch die Verteilung der Zustände mit unterschiedlicher Kopplung V . Bei hohen Temperaturen kann das Reaktionszentrum beinahe jede mögliche Konformation einnehmen. Erniedrigung der Temperatur führt zu einer stärkeren Besetzung der energetisch günstigen Konformationen, die gleichzeitig einen hohen Wert von V besitzen. Deshalb kommt es zu einer zusätzlichen Beschleunigung

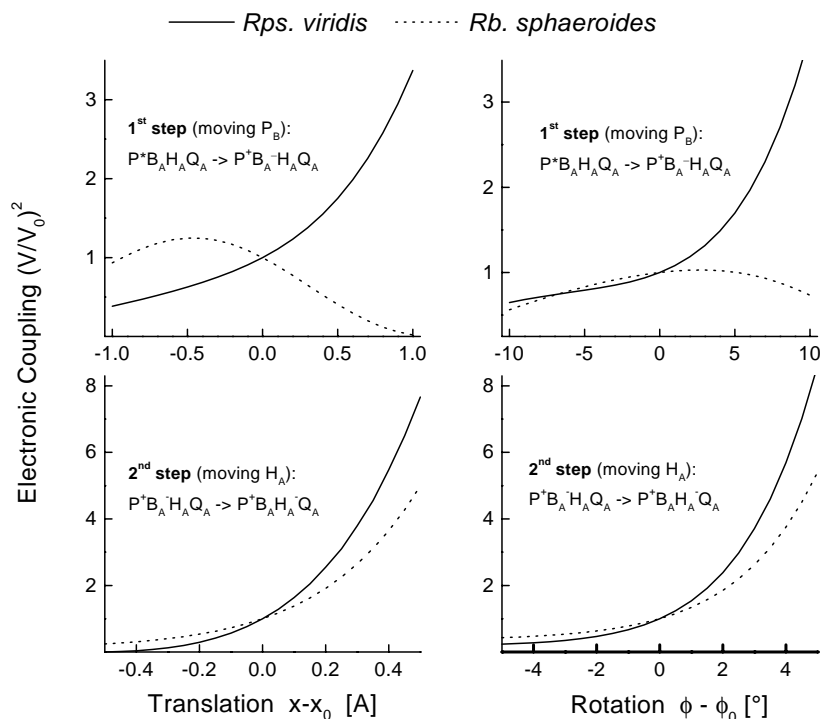


Abbildung 2.7: Änderung der elektronischen Kopplung bei kleinen Translationen und Rotationen, gerechnet für den ersten Elektronentransferschritt (oben) und den zweiten Elektronentransferschritt (unten) für *Rps. viridis* (durchgezogene Linie) und *Rb. sphaeroides* (gestrichelte Linie).

nigung des Elektronentransfers bei Erniedrigung der Temperatur. Ist die Temperatur so niedrig, daß praktisch nur noch eine Konformation besetzt ist, findet keine weitere Beschleunigung mehr statt. Die Verteilung der Konformationen der Chromophore, sowie die Tatsache, daß einige Anordnungen energetisch günstiger sind als andere, sorgt dafür, daß die Temperaturabhängigkeit der Kopplung erklärt werden kann. Die Tatsache, daß sich die Anordnung der Chromophore so stark auf die Elektronentransferzeit auswirkt, erklärt auch die großen Unterschiede in den gemessenen Transferzeiten zwischen Wildtyp und den Mutanten. Durch Entfernen oder Hinzufügen einer Wasserstoffbrückenbindung können die Chromophore verschiedene Lagen gegeneinander einnehmen, die unterschiedlich stark koppeln. Die Berechnung der mittleren Rate erfolgt in diesem Modell vereinfacht auf folgende Weise: es gibt in erster Näherung zwei verschiedene Subzustände (siehe Abbildung 2.8): einen stark koppelnden Subzustand C_h , mit dem elektronischen Matrixelement V_h und der Energie E_h , und schwach koppelnde Subzustände C_l , mit dem entsprechenden elek-

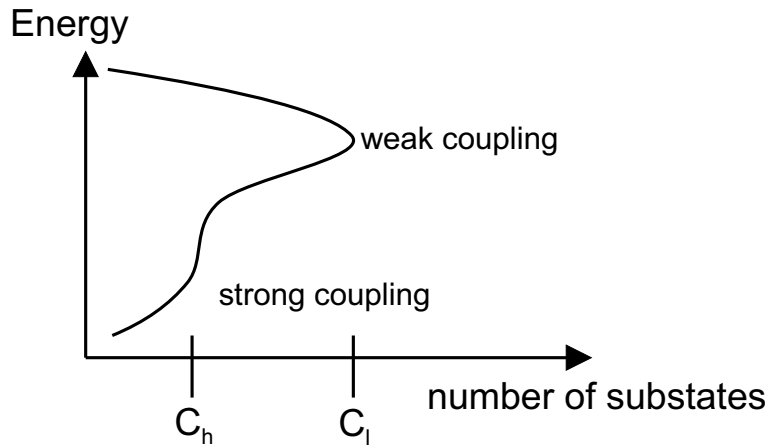


Abbildung 2.8: Verteilung der Zustände und Näherung durch die zwei Zustände C_h und C_l bei Raumtemperatur.

tronischen Matrixelement V_l und der Energie E_l . Es wird davon ausgegangen, daß es nur einen Zustand mit optimaler Kopplung V_h gibt, und daß alle anderen Konformationszustände C_l mit einem statistischen Gewicht n entartet sind. Während bei Raumtemperatur der optimal koppelnde Zustand C_h nur gering bevölkert ist, und hauptsächlich die schwächer koppelnden Subzustände C_l besetzt sind, ist bei tiefen Temperaturen nur der Zustand C_h besetzt. Die durchschnittliche Elektronentransferrate berechnet sich aus einem Anteil k_h , der bei tiefen Temperaturen dominiert, und einem Anteil k_l , der bei hohen Temperaturen dominiert. Beide Raten werden gewichtet mit der relativen Konzentration der Zustände $[C_h]$ bzw. $[C_l]$ [Hup00].

$$k_{ET} = [C_h]k_h + [C_l]k_l \quad (2.15)$$

Für den aktivierungslosen Fall ($\Delta G = -\lambda$) und große Reorganisationsenergien (etwa 800 cm^{-1}) erhält man für die Elektronentransferrate k_h bzw. k_l folgenden Ausdruck:

$$k_{h,l} = k_{h,l}(0) \lambda \sqrt{\frac{\exp(\frac{\hbar\omega}{kT}) - 1}{\exp(\frac{\hbar\omega}{kT}) + 1}} \quad (2.16)$$

mit

$$k_{h,l}(0) = \frac{2\pi V_{h,l}^2}{\hbar\omega \sqrt{2\pi\Delta G/\hbar\omega}}$$

Ist die Anzahl der energetisch ungünstigeren Konformationen $[C_l]$ klein, und $\hbar\omega/kT$ viel größer als eins, so ist die Elektronentransferrate konstant (Tiefemperaturimes), andernfalls sinkt die Elektronentransferrate mit steigender Temperatur.

Das hier angegebene Reaktionsmodell gibt auch Erklärungen, wie bei starker Kopplung zwischen den Chromophoren nach erfolgreichem Elektronentransfer eine Rückreaktion vermieden werden kann. Nicht nur die Temperatur, sondern auch die Ladungsverteilung an den Chromophoren kann die Werte für die Kopplung V beeinflussen. So ändert sich, nachdem das Elektron vom Donor auf den Akzeptor übergegangen ist, die Ladungsdichte der jeweiligen Chromophore, und damit auch die Kopplung zwischen ihnen. Im optimalen Fall wird die Kopplung zwischen den beiden Chromophoren, die gerade ein Elektron ausgetauscht haben, kleiner, und die Kopplung zwischen den nächsten Paaren größer, so daß Elektronentransfer nur in eine Richtung möglich ist. Dies erklärt die hohe Quantenausbeute des Elektronentransfers auch im adiabatischen Bereich.

2.3 Kohärente Effekte

Durch die Verbesserung der experimentellen Zeitaufösung in den letzten Jahren, und die damit verknüpfte spektrale Breite der Pulse, wird in den Experimenten immer öfter nicht nur ein einzelnes Schwingungsniveau im ersten angeregten elektronischen Zustand angeregt, sondern eine kohärente Überlagerung von benachbarten Schwingungszuständen. Das so entstandene Wellenpaket oszilliert periodisch in der entsprechenden Potentialparabel hin und her (siehe Abbildung 2.9). Aufgrund anharmonischer Effekte (Phasen- und Energierelaxation) verbreitert es sich relativ schnell und verliert Energie. Innerhalb weniger Pikosekunden verschwindet der kohärente Zustand und es stellt sich eine thermische Verteilung ein. Ist die Zeitaufösung des Meßsystems kürzer als die Relaxationszeit der Wellenpaketsbewegung, so können diese Oszillationen experimentell beobachtet werden. Während der Bewegung des Wellenpakets im S_1 -Zustand ist die Absorption des Moleküls moduliert: im Bereich der stimulierten Emission ändert sich das Meßsignal jedesmal, wenn das Wellenpaket den Bereich der S_1 -Fläche erreicht, an dem die Wellenlänge des Abtastpulses gleich dem Energieunterschied zwischen S_1 -Fläche und Grundzustandsfläche ist.

Tastet man genau im Maximum der stimulierten Emission, also im Minimum der S_1 -Potentialparabel ab, so erhält man eine Oszillation mit der doppelten Frequenz als am Rand der Parabel, da hier das Wellenpaket zweimal pro Periode durchläuft. Bei schlechterer Zeitaufösung verschwindet die Oszillation an dieser Stelle. Obwohl davon ausgegangen wird, daß der Hauptanteil der Oszillationen durch eine kohärente Kernbewegung im ersten angeregten elektronischen Zustand erzeugt wird, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß während des Anregungsimpulses

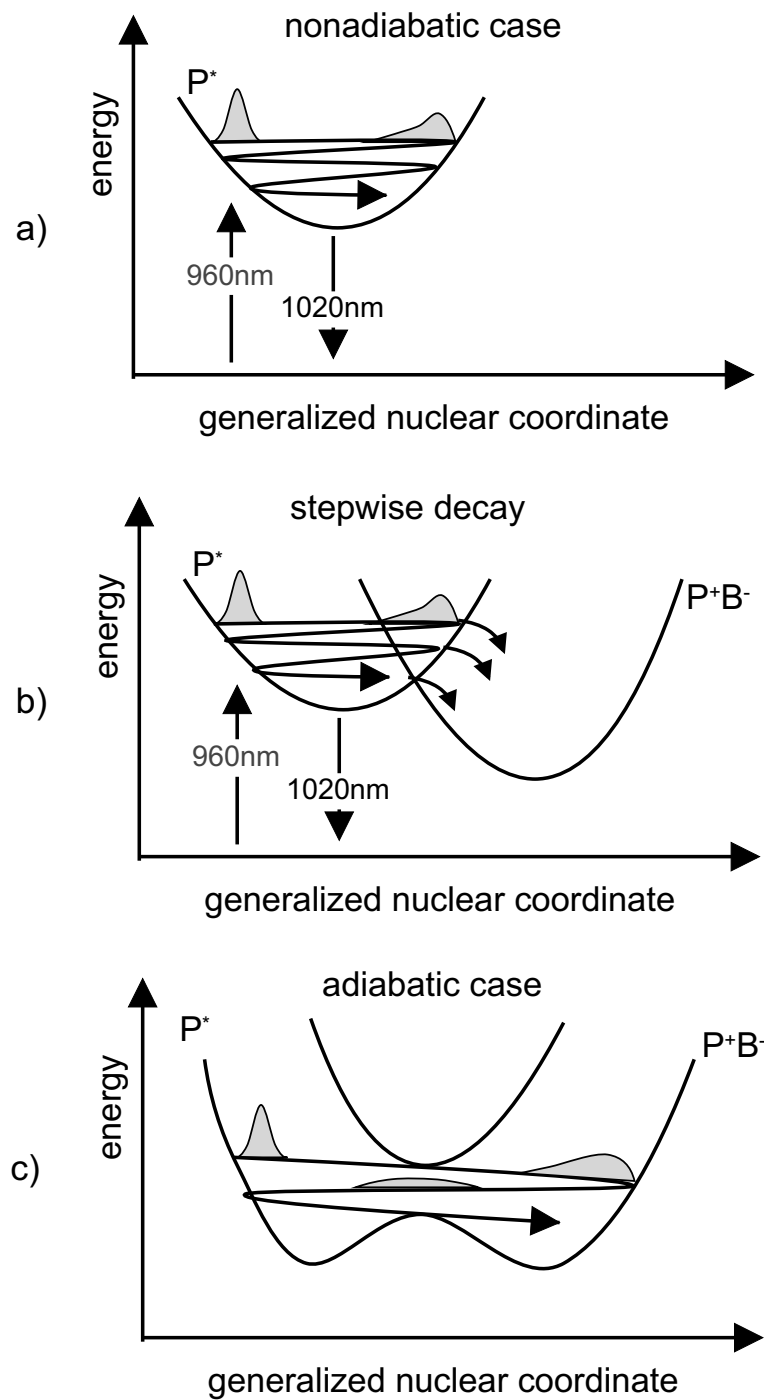


Abbildung 2.9: Einfaches eindimensionales Schema zur Erklärung der oszillatorischen Effekte im Bereich der stimulierten Emission: a) nichtadiabatischer Fall, b) stufenweiser Zerfall, c) adiabatischer Fall. Durch die Anregung bei $\lambda_{pu} = 970 \text{ nm}$ wird ein Wellenpaket präpariert, welches sowohl die Phasenkohärenz, als auch Energie verliert.

durch stimulierte Ramanprozesse Schwingungsniveaus im Grundzustand kohärent besetzt werden [Vos91] (Grundzustandswellenpakete). Diese Grundzustandswellenpakete machen sich im Bereich der Grundzustandsabsorption bemerkbar. Im Falle starker Kopplung zwischen verschiedenen elektronischen Zuständen könnte elektronische Kohärenz auftreten. Dies würde zu einer oszillatorischen Komponente in der Besetzung der gekoppelten Zustände führen, mit einer Frequenz, die ungefähr dem doppelten der Austauschenergie entspricht [Jea91]. Beide Mechanismen - kohärente Kernbewegung und elektronische Kohärenz - können auch parallel auftreten, je nach Stärke der Kopplung. Eine entscheidende Frage bei der Deutung solcher kohärenter Effekte, ist, ob die beobachtete Oszillation an die Elektronentransferbewegung gekoppelt ist. Wie in Abbildung 2.9 gezeigt, kann man drei Fälle unterscheiden:

a) die Oszillation ist nicht an die Elektronentransferbewegung gekoppelt. Das Wellenpaket schwingt im Ausgangszustand P^* hin und her. Liegt die Abtastwellenlänge im Bereich der stimulierten Emission des Zustandes (Pfeil) oder im Bereich der excited-state-Absorption, so ist das Meßsignal mit der Frequenz der Schwingung moduliert. Wenn die Kopplung zwischen Donor und Akzeptor so klein ist, daß der Elektronentransfer erst von einem vollständig relaxiertem Ausgangszustand aus stattfindet ($\gamma_{LZ} \ll 0.5$), koppelt diese Wellenpaketsbewegung nicht an den Elektronentransfer. Es ist außerdem möglich, daß die Wellenpaketsbewegung nicht entlang der Reaktionskoordinate stattfindet. Auch hier kann ein moduliertes Meßsignal im Bereich der stimulierten Emission beobachtet werden, obwohl die Oszillation nicht direkt an den Elektronentransfer koppelt.

b) Die Wellenpaketsbewegung koppelt an die Elektronentransferreaktion (der Landau-Zener-Faktor γ_{LZ} liegt zwischen 0.5 und 1): das durch den kohärenten Anregungsimpuls erzeugte Wellenpaket oszilliert im Ausgangszustand, doch diesmal ist die Kopplung zwischen Donor und Akzeptor so groß, daß der Elektronentransfer effektiv stattfindet, wenn die Kohärenz des Wellenpakets noch nicht verloren ist. In diesem Fall findet Elektronentransfer jedesmal statt, wenn das Wellenpaket an den Kreuzungspunkt von Donor- und Akzeptorparabel gelangt. Die Wahrscheinlichkeit des Transfers ist durch die Stärke der Kopplung gegeben. Man beobachtet eine stufenweise Entvölkerung des Ausgangszustandes, korreliert mit einer stufenweisen Bevölkerung des Produktzustandes. In diesem Bereich kann nur schwer zwischen einer reinen Wellenpaketsbewegung und der stufenweisen Besetzungsänderung der Zustände unterschieden werden.

c) Eine besonders starke Kopplung der Wellenpaketsbewegung an den Elektronentransfer findet man für adiabatischen Elektronentransfer ($\gamma_{LZ} \gg 1$). Hier oszilliert das Wellenpaket auf den adiabatischen Potentialflächen hin und her (siehe Kapitel 2.2.2.2).

Eine Zuordnung der Oszillationen zu den im Reaktionszentrum vorkommenden Schwingungen erfolgt durch Vergleich der beobachteten Oszillationsfrequenzen mit Schwingungsbanden, die aus Ramanmessungen oder Lochbrennexperimenten bekannt sind. Man unterscheidet grundsätzlich niederenergetische Moden ($1-100 \text{ cm}^{-1}$), die i.A. intermolekulare Schwingungen repräsentieren und höherenergetische Moden, die intramolekulare Schwingungen der Chromophore darstellen.

Kapitel 3

Isomerisierung des Retinals in Bakteriorhodopsin des Bakteriums *Halobacterium salinarum*

Im letzten Kapitel wurde ein Beispiel für die Chlorophyll gestützte Photosynthese anhand des Reaktionszentrums von *Rps. viridis* beschrieben. Hier soll nun eine weitere Möglichkeit zur Nutzung des Sonnenlichtes zur Energiegewinnung gezeigt werden: die Retinal gestützte Photosynthese in Bakteriorhodopsin des Bakteriums *Halobacterium salinarum*. Hier wird nicht, wie beim Reaktionszentrum nach der Lichtanregung ein Elektron sondern ein Proton durch die Zellmembran transferiert. Startmechanismus nach der Absorption eines Photons ist die schnelle Isomerisierung des Retinals.

3.1 Retinal gestützte Photosynthese: Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum*

Ein weiteres Beispiel, wie durch die photosynthetische Nutzung des Sonnenlichtes ein Lebewesen in schwierigsten Lebensräumen entstehen und überleben konnte, ist das Halobakterium *Halobacterium salinarum*. Halobakterien gehören zu den Archaea, die heute als ein drittes Reich der Lebewesen neben Eucarya und Eubacteria betrachtet werden [Woe77, Oes96]. Sie leben häufig unter extremen Umweltbedingungen, bei Temperaturen zwischen 40 und 50 °C und in Salzseen mit bis zu 4 M NaCl [Sto67]. Da unter diesen Bedingungen der Sauerstoffgehalt sehr gering sein kann, können Halobakterien neben der Atmung zwei anaerobe Stoffwechselwege zur

Energieversorgung nutzen, die Argininfermentation [Har77] und die retinalabhängige Photosynthese [Oes73]. Die Umwandlung von Lichtenergie in chemisch nutzbare Energie (ATP) geschieht dabei in der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) [Oes73]. Abbildung 3.1 zeigt den Aufbau eines Halobakteriums. Außer der Proto-

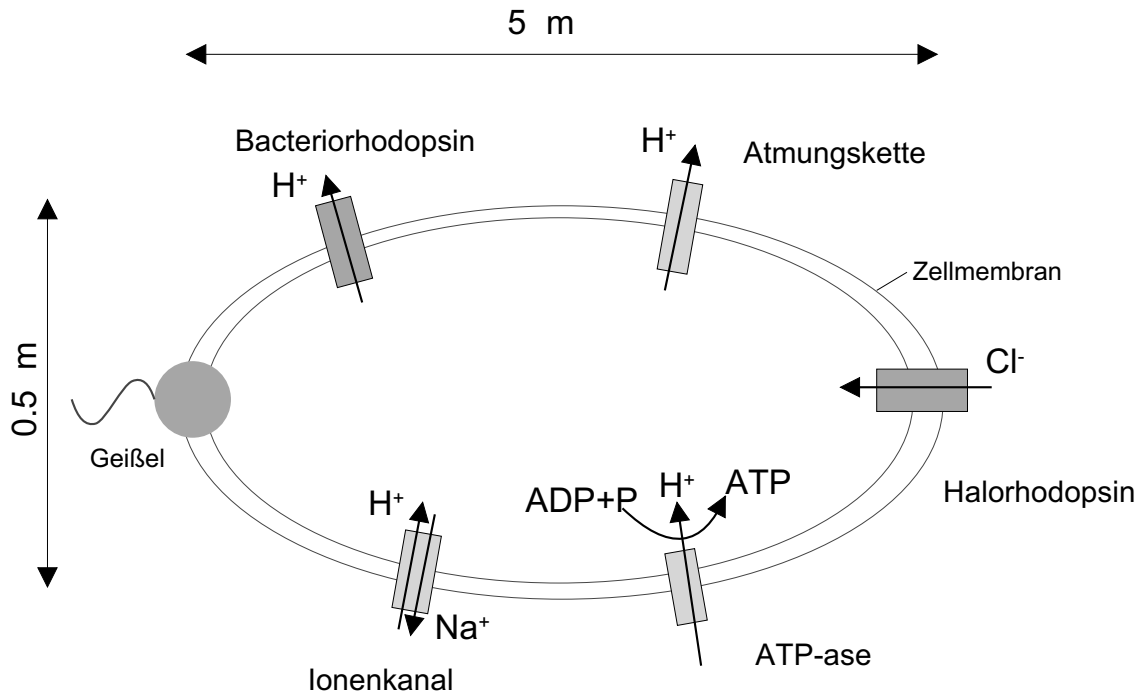


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines Halobakteriums mit den wichtigsten Membranuntereinheiten.

nenpumpe Bakteriorhodopsin befinden sich in der Zellmembran noch drei andere Arten von retinalhaltigen Proteinen: Halorhodopsin (HR) und die Sensorrhodopsine SR I und SR II. Während BR zur Bildung eines elektrochemischen Potentials Protonen aus der Zelle hinaus transportiert, transportiert HR Chloridionen in die Zelle [Sch82]. Dies ist notwendig, damit die Zelle während des Wachstums im osmotischen Gleichgewicht mit ihrer salzhaltigen Umgebung bleibt. Die beiden Sensorrhodopsine wirken als Photorezeptoren, die phototaktisches Verhalten der Zelle ermöglichen [Spu92, Oes93]. SR I vermittelt sowohl positive Phototaxis hin zu gelbem Licht, der für BR optimalen Lichtqualität, als auch eine photophobische Reaktion bei Erniedrigung der Gelblichtintensität oder bei zusätzlichem UV-Licht [Spu84]. SR II bewirkt eine photophobische Reaktion auf Blaulicht [Tak85]. In dieser Arbeit wurde nur die Protonenpumpe BR untersucht, die wegen ihrer chemischen Stabilität auch für An-

wendungen außerhalb der Grundlagenforschung sehr interessant ist. So wurden beispielsweise holographische Eigenschaften von BR-Filmen untersucht [Brä91, Tho91]. Es ist außerdem möglich BR zur optischen Signalverarbeitung, als dynamischen optischen Filter, zur optischen Mustererkennung [Brä91] oder sogar als organischen Massenspeicher [Kuh98] zu nutzen. Zusätzlich wurden schon verschiedene nichtlineare optische Effekte an BR untersucht [Brä91]. Auch wegen dieser vielfältigen interessanten Eigenschaften ist BR heute noch ein aktuelles Forschungsobjekt, und soll im Folgenden etwas genauer beschrieben werden.

Abbildung 3.2 zeigt die Struktur von BR, entnommen aus dem Eintrag der Protein Data Bank (PDB 1AT9): sieben α -Helices durchspannen die Lipidmembran und umgeben den Chromophor Retinal. Das Retinal ist über eine protonierte Schiff'sche Base an den Lysinrest an Position 216 der Helix G gebunden (siehe Abbildung 3.2), und trennt den cytoplasmatischen (CP) Kanal (Zellinneres) vom extrazellulären (EC) Kanal (Zelläußeres). Retinal kann im elektronischen Grundzustand verschie-

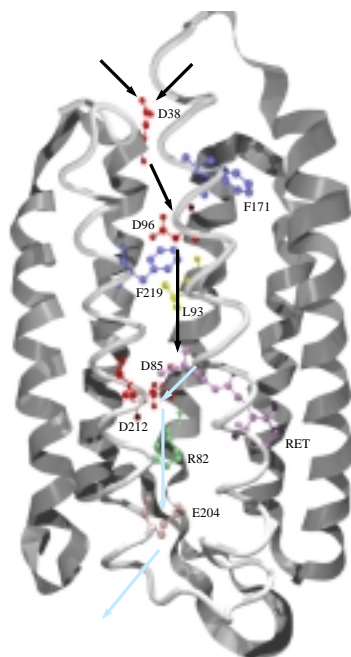


Abbildung 3.2: Strukturmodell von Bakteriorhodopsin (aus PDB-Eintrag 1AT9 gemessen mit einer Auflösung von 3\AA , das Bild stammt von der Theoretical Biophysics Group, Beckman Institute, University of Illinois at Urbana-Champaign). Gekennzeichnet sind das Retinal (Ret) und die Aminosäuren Asp36, Asp96, Phe171, Phe219, Asp212, Asp85, Leu82 und Glu204. Der mögliche Transportweg des Protons durch das Protein wurde mit Pfeilen gekennzeichnet.

dene Isomerisierungszustände einnehmen [Spe77, Wal68]. Die für BR bedeutenden Zustände, all-trans und 13-cis sind in Abbildung 3.3 zu sehen. Im dunkeladaptierten

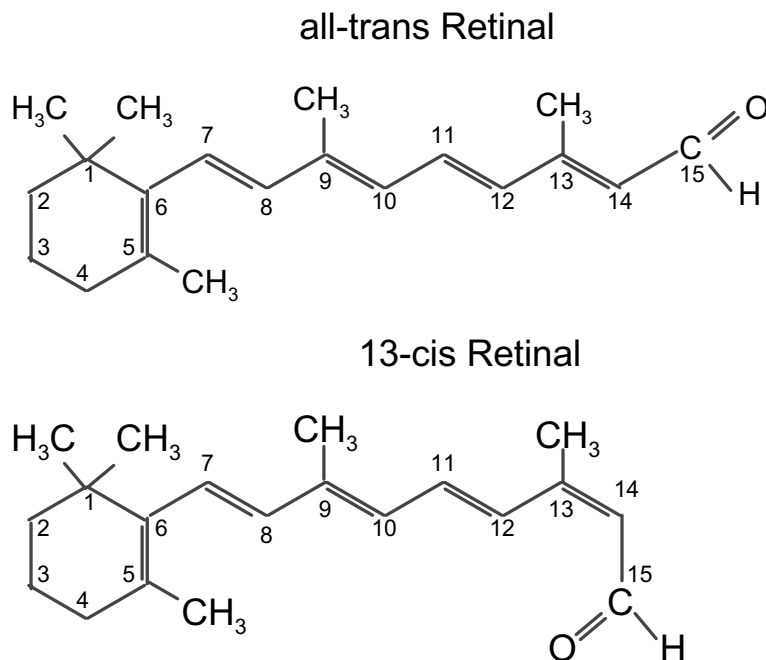


Abbildung 3.3: Verschieden Konfigurationen des Retinalmoleküls: a) all-trans Retinal, b) 13-cis Retinal.

Zustand liegt das Retinal bei BR zu 50% in der all-trans und zu 50% in der 13-cis, bzw. 15-cis Konfiguration vor [Pet77, Har84, Pet87]. Da der Dunkelzyklus, der nach Lichtanregung des dunkeladaptierten Zustandes gestartet werden kann, ineffektiv in Bezug auf das Pumpen von Protonen durch die Membran ist, benötigt man die Probe im lichtadaptierten Zustand, der durch kontinuierliche Beleuchtung der Probe mit Licht zwischen 450 und 650 nm erreicht wird. Der lichtadaptierte Zustand enthält zu 100% Retinal in der all-trans Form. Die physiologische Bedeutung des Dunkelzustandes ist noch nicht verstanden [Pet87].

Während reines, an eine unprotonierte Schiff-Base gebundenes Retinal in Methanol-Lösung bei einer Wellenlänge von 360 nm absorbiert, verschiebt sich die Absorptionsbande für protoniertes Retinal nach 450 nm. Ist das Retinal über eine protonierte Schiff-Base an das BR-Proteingerüst gebunden, verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 570 nm [Koy91]. Durch diese, mit der Kopplung des Chromophors an das BR-Proteingerüst verbundene Verschiebung des Absorptionsmaximums von Retinal kann die zur Verfügung stehende Strahlung der Sonne besser

ausgenutzt werden [Gai98]. Bisherige zeitaufgelöste Messungen im Femtosekunden- bis Mikrosekundenbereich führten zu folgendem Modell für den Photosynthesezyklus von lichtadaptierten BR (siehe Abbildung 3.4): nach Absorption eines Photons

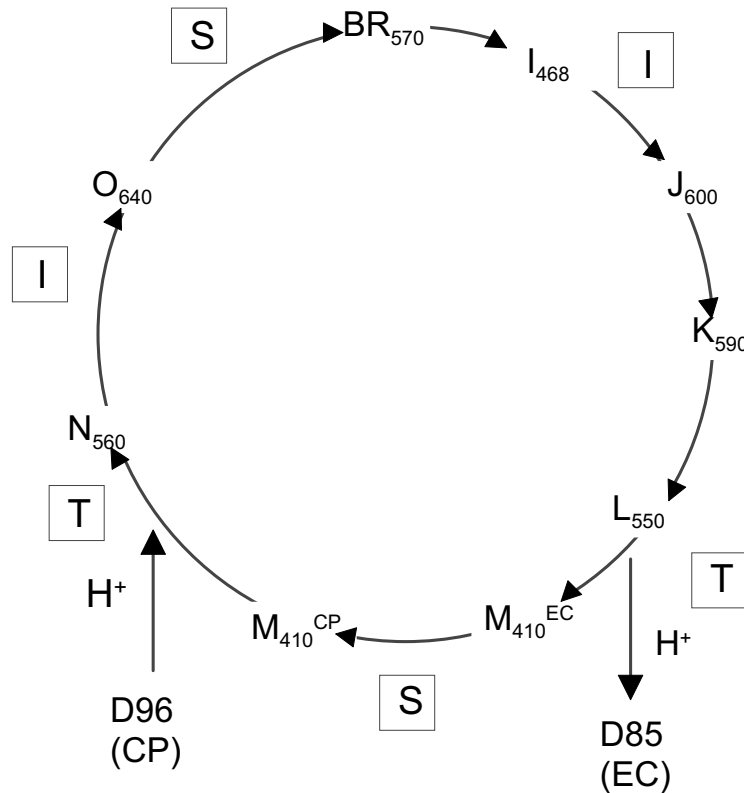


Abbildung 3.4: Photozyklus von Bakteriorhodopsin nach [Oes98]

durch das Retinal, isomerisiert die all-trans Form in ca. 500 fs zur 13-cis Form (Zustand J_{600}) [Nus85, Dob88, Mat88], J_{600} zerfällt in 3 ps in den Grundzustand K_{590} [Pol86, Log96], K_{590} bildet in $1.5 \mu s$ L_{550} . Beim Übergang von L_{550} zum Zustand M_{410} verliert die protonierte Schiff'sche Base ihr Proton innerhalb ca. $50 \mu s$ an die Aminosäure D85 des extrazellulären Kanals. Durch die Aufnahme eines Protons von der Aminosäure D96 des cytoplasmatischen Kanals wird die Schiff-Base reprotoniert (M_{410} nach N_{560} in einigen ms). Um diesen Schritt zu ermöglichen müssen zwei verschiedene M-Zustände mit unterschiedlichen pK-Werten und verschiedenen Zugänglichkeiten der Schiff-Base für ein Proton existieren [Oes98, Hau97]. Da diese beiden unterschiedlichen Zustände offensichtlich das gleiche Absorptionsmaximum besitzen, werden sie mit M_{410}^{EC} bzw. mit M_{410}^{CP} bezeichnet. Von N_{560} nach O_{640} reisomerisiert das Retinal von der 13-cis Form in die all-trans Form und relaxiert von

dort aus in den Ausgangszustand BR_{570} . Die Quantenausbeute des Photozyklusses ist gegeben durch die Quantenausbeute der ersten Isomerisierung von all-trans zu 13-cis. Da vom angeregten Zustand BR^* aus ein Teil der Moleküle in den Ausgangszustand BR_{570} rekombiniert, ist die Quantenausbeute der Reaktion nur 60%. Dieser Wert wurde mit unterschiedlichen Methoden bestimmt, z.B. Beobachtung der Anzahl der BR-Moleküle im M-Zustand [Tit90] und ist offensichtlich unabhängig von der Lebensdauer des S_1 -Zustandes [Log97].

Vereinfacht sind die wesentlichen Aktionen im Photosynthesezyklus mit drei Reaktionsmechanismen darzustellen: Isomerisierung (I), Ionentransfer (T) und Switch (S). Da der Ionentransport (Protonen bei BR, Chloridionen bei HR) kontinuierlich stattfindet, müssen die Moleküle einen Zyklus mehrfach durchlaufen können. Dies ist nur dann möglich, wenn die einzelnen Schritte, die im Laufe eines Zyklusses entstehen, zu einem späteren Zeitpunkt wieder rückgängig gemacht werden. Unter dieser Voraussetzung wurde von Haupts et al. folgendes Bild entwickelt [Hau97]: Alle Proteine starten von einem relaxierten Dunkelzustand, deshalb muß der erste Schritt eine lichtinduzierte Isomerisation des Retinals sein (I^*). Um die oben genannte Bedingung zu erfüllen, muß diese Isomerisation zu einem späteren Zeitpunkt im Zyklus wieder rückgängig gemacht werden. Dies kann entweder durch eine zweite Lichtanregung, oder durch eine thermisch aktivierte Rückisomerisierung erfolgen. Weitere Bestandteile des Photosynthesezyklusses sind die Änderung der Zugänglichkeit der Schiffschen Base zwischen De- und Reprotonierung. Diese Zugänglichkeitsänderung wird als Schaltvorgang (S) bezeichnet, und könnte entweder durch eine große strukturelle Änderung in der Umgebung des Retinals hervorgerufen werden, wie z.B. ein bereits beobachtetes Abknicken von Helices während des Photozyklusses [Fod88] oder durch eine kleine Änderung des Retinals selbst, wie z.B. eine Umstrukturierung von 13-cis-14-cis nach 13-cis-14-trans [Sch78], verursacht werden. Schließlich folgt der Ionentransfer (T), der die eigentliche De- bzw. Reprotonierung der Schiffschen Base beinhaltet. In nativen BR lautet die Schrittreihenfolge I^* -T-S-T-I-S: nach einer lichtinduzierten Isomerisierung von all-trans nach 13-cis (I^*) wird die Schiffsche Base durch Weitergeben eines Protons an die Aminosäure D85 deprotoniert (T). Von dort aus gelangt das Proton über weitere Aminosäuren durch den cytoplasmatischen Halbkanal ins Zellinnere. Nach der Zugänglichkeitsänderung der Schiffschen Base vom cytoplasmatischen auf den extrazellulären Halbkanal (S) kann die Reprotonierung der Schiffschen Base nur noch über den extrazellulären Halbkanal erfolgen [Oes98]. Diese Reprotonierung erfolgt, indem die Aminosäure D96 zuerst ein Proton an die Schiffsche Base abgibt und dann selbst wieder ein Proton aufnimmt (T). Auf

diese Weise wandert ein "H⁺-Loch" über weitere Aminosäuren durch den extrazellulären Halbkanal aus der Zelle. Um den Photosyntheszyklus vollständig zu machen reisomerisiert das Retinal thermisch (I) und die Zugänglichkeit der Schiffischen Base schaltet wieder zum cytoplasmatischen Halbkanal (S).

In nativem HR werden die eben beschriebenen Vorgänge in genau der gleichen Reihenfolge durchlaufen. Es ist durch Entwicklung interessanter Mutanten und durch Änderung des pH-Wertes und der Belichtung gelungen, die Reihenfolge der durchlaufenen Schritte zu vertauschen und so sowohl Richtung als auch die Art des Ionentransportes (Protonen oder Chloridionen) durch die Membran zu ändern [Hau97].

In dieser Arbeit soll nur der erste der oben beschriebenen Vorgänge, die lichtinduzierte Isomerisierung genauer untersucht werden. Wie man anhand von Abbildung 3.4 erkennen kann, ist die Isomerisierung spätestens nach ca. 3.5 ps im Zustand K₅₉₀ abgeschlossen [Hau99]. Allerdings ist die Rolle der Zwischenzuständen I₄₆₀ und J₆₀₀ im Photozyklus noch nicht vollständig geklärt [Dob88, Zin91, Gai98]. Gerade Messungen an einem BR-Analog, bei dem die C₁₃=C₁₄-Bindung des Retinals blockiert ist, und das Retinal nicht vollständig isomerisieren kann, liefern neuen Diskussionsstoff [Ye99b, Ye99a].

Im nächsten Kapitel sollen einige Modelle vorgestellt werden, mit denen in der Vergangenheit die ersten Schritte im Photozyklus von BR erklärt wurden. Während zuerst eine eindimensionale Bewegung entlang einer Reaktions- oder Isomerisationskoordinate diskutiert wurde, wird aufgrund der Komplexität der Reaktion in letzter Zeit immer öfter ein zweidimensionales Modell mit einer konischen Durchschneidung vorgeschlagen.

3.2 Isomerisierungsmodelle

Bei der Isomerisierung des Retinals besteht die Bewegung hauptsächlich aus einer Rotation um die C₁₃-C₁₄ Doppelbindung. Die entsprechende Reaktionskoordinate wird als Isomerisationskoordinate bezeichnet. Da die Reaktion innerhalb eines eindimensionalen Modells, mit einer koppelnden Mode nur schwierig erklärt werden kann, verwendet man das Konzept der konischen Durchschneidung zwischen der S₁- und S₀-Potentialfläche, bei der verschiedene Moden eine Rolle spielen. Theoretische Modelle die mithilfe von Molekulardynamiksimulationen versuchen, die genaue Bewegung des Retinals [Zho93], oder die Retinalschwingungen quantenmechanisch nachzuvollziehen [Gro90] sind zur Zeit noch viel zu ungenau, und sollen hier nicht

weiter diskutiert werden. Einen Überblick über die verschiedenen Methoden findet sich in [Sch95]. Im folgenden Kapitel werden ein- und mehrdimensionalen Modelle kurz vorgestellt, die bisher zur Erklärung der Isomerisierung verwendet wurden.

3.2.1 Eindimensionale Modelle

In freiem Retinal kann die Isomerisierung sowohl von all-trans nach 11-, 13-, 15-, usw. -cis, als auch umgekehrt ablaufen. Es ist deshalb plausibel, die Potentialflächen so zu konzipieren, daß sowohl die cis nach trans Isomerisierung, als auch die trans nach cis Isomerisierung mit sinnvollen Quantenausbeuten möglich sind. Außerdem kann bei Messungen an BR wie auch an HR [Arl96a] stimulierte Emission bis zu einer Wellenlänge von 1000 nm beobachtet werden, was darauf hin deutet, daß in einem sehr weiten Bereich der Übergang zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand möglich ist. Abbildung 3.5 zeigt eine mögliche Anordnung, die diesen Bedingungen gerecht wird.

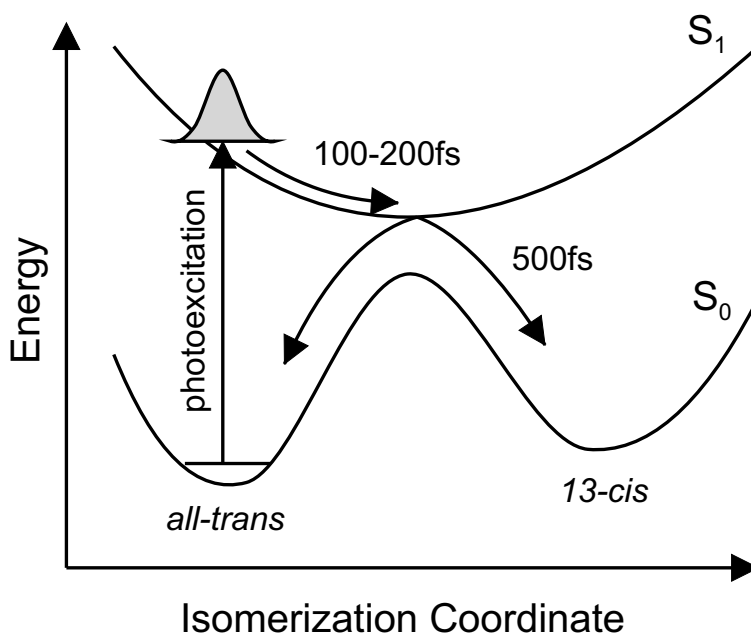


Abbildung 3.5: Adiabatische Potentialflächen des S_0 und S_1 -Zustandes für die Isomerisierung von BR.

Da im angeregten Zustand keine Potentialbarriere überwunden werden muß, spricht man in diesem Zusammenhang von einer barrierelosen Reaktion: durch optische Anregung gelangt das Retinal in die Franck-Condon-Region des ersten an-

geregten elektronischen Zustandes (S_1). Das durch einen kurzen Anregungsimpuls präparierte Wellenpaket relaxiert auf der S_1 -Potentialfläche zum Minimum, welches sich direkt über dem Maximum der Grundzustandpotentialfläche befindet. Findet an dieser Stelle der Übergang in den Grundzustand statt, so kann das Wellenpaket mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zurück in den Ausgangszustand rekombinieren (bei BR: all-trans), oder in den Produktzustand (bei BR: 13-cis) reagieren. Durch diese Potentialflächenanordnung sind beide Isomerisierungsrichtungen möglich, und die Quantenausbeute des jeweiligen Prozesses wird durch die Form der Potentialflächen bestimmt. Würden die Reaktionen auf der Grundzustandpotentialfläche ablaufen, so wären sie entweder unmöglich, oder viel langsamer, da dort eine hohe Aktivierungsschwelle zu überwinden ist. Im elektronisch angeregten Zustand, wo keine Potentialbarriere überwunden werden muß, beobachtet man bei derartigen Prozessen Zeitkonstanten von nur wenigen hundert Femtosekunden [Sch93]. Einen Ansatz zu theoretischer Beschreibung derartiger Prozesse bietet das Bagchi, Fleming, Oxtoby-Modell (BFO-Modell) [Lin90], das die Bewegung im angeregten Zustand durch eine Wellenfunktion in einem sehr flachen harmonischen Potential beschreibt. Mithilfe von Molekulardynamiksimulationen von Warshel et al. [War91] aufbauend auf der 3-D Struktur von Henderson und Mitarbeitern [Hen90], konnte der Prozeß innerhalb des angeregten Zustandes bei BR genauer beschrieben werden. Diskutiert werden verschiedene Potentialflächenanordnungen, inklusive ungedämpfter und gedämpfter Bewegung des Wellenpaketes im angeregten Zustand. Die bekannte Quantenausbeute vom Ausgangszustand all-trans nach 13-cis für BR von 60%, erhält man in dem von Warshel berechneten Modell, wenn man eine gedämpfte Bewegung des Wellenpakets innerhalb der S_1 -Potentialfläche annimmt, und sich das Minimum der S_1 -Potentialfläche direkt über dem Maximum der S_0 -Potentialfläche befindet. Dies bedeutet, daß die schnelle Relaxationskomponente (200 fs) zumindest teilweise den Isomerisierungsprozeß des Retinalmoleküls repräsentiert. Erste Femtosekundenmessungen von Dobler et al. und Mathies et al. an BR 1988 konnten im Rahmen dieses Modells erklärt werden [Dob88, Mat88]: Die Lichtanregung von BR startet eine ultraschnelle Torsionsbewegung zum Minimum der Potentialfläche des angeregten Zustandes (200 fs). Inwieweit das Retinal in dieser Zeit schon isomerisiert ist, kann nicht festgestellt werden. Von dieser etwas gedrehten Konformation relaxiert das Retinal zurück zum Grundzustand, wobei entweder der Ausgangszustand all-trans, oder das Photoprodukt 13-cis produziert wird. Um die sehr schnelle Torsionsbewegung erklären zu können, muß die S_1 -Potentialfläche in der Franck-Condon-Region steil sein. Zwar wurde für Retinal in Lösung eine Potentialflächenanordnung

gefunden, bei der die S_1 -Potentialfläche in der Franck-Condon-Region flach ist, allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Proteinumgebung, die für die erheblich höhere Effizienz der Isomerisierung von Retinal in BR verantwortlich ist, auch die Form der S_1 -Potentialfläche verändert. Für die in Abbildung 3.5 gezeigte Potentialflächenanordnung müßte allerdings die langwellige stimulierte Emission um 100-200 fs verzögert auftreten. In Fluoreszenzmessungen mit einer Zeitauflösung von 40 fs konnten keine Verzögerung beobachtet werden [Dob88, Du93].

Ein modifiziertes Modell der Potentialflächen wurde von Anfinrud und Mitarbeitern vorgeschlagen. Aus experimentellen Ergebnissen, wie dem sofortigen Einsetzen der stimulierten Emission und der Existenz einer zusätzlichen excited-state-Absorptionsbande bei ca. 770 nm wird ein Modell bestehend aus drei elektronischen Zuständen entwickelt (siehe Abbildung 3.6). Das ultraschnelle Auftreten der stimulierten Emission (kürzer als 30 fs) und die von Hasson et al. angegebene vernachlässigbare Entwicklung des Spektrums der stimulierten Emission mit der Zeit werden dahingehend gedeutet, daß die Anregung von BR in eine sehr flache Region der S_1 -Potentialfläche stattfindet, nicht wie in dem oben gezeigten Modell (siehe Abbildung 3.5) in die abfallende Flanke der S_1 -Potentialfläche [Has96]. Die S_1 -Potentialfläche aus Abbildung 3.6 enthält eine kleine Potentialbarriere, die die Franck-Condon-Region von der steilen reaktiven Region entlang der Isomerisationskoordinate trennt. Die gemessene Zeit, in der sich das Retinal im angeregten Zustand befindet, ist also definiert durch die Zeit die es benötigt, die Potentialbarriere zu überqueren. Gelangt es einmal auf den steil abfallenden Teil der Potentialfläche, so ist die Reaktion sehr schnell. Dieser Schritt könnte eventuell durch die 200 fs Kinetik erklärt werden, es wäre dann allerdings unklar, welche Bedeutung der 500 fs-Kinetik zugewiesen werden könnte. Außerdem klärt auch dieses Modell nicht das instantane Auftreten der langwelligen stimulierten Emission. Bei Abtastwellenlängen zwischen 625 nm und 714 nm sehen Hasson et al. bei kurzen Verzögerungszeiten nur eine Absorptionzunahme, wohingegen Messungen mit besserer Zeitauflösung kurz nach dem Zeitnullpunkt die kurzwellige stimulierte Emission zeigen (diese Arbeit und [Dob88, Bar98]). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß weder das Zweizustandsmodell (Abbildung 3.5) noch das Dreizustandsmodell (Abbildung 3.6) die ersten Schritte des Photozyklus von BR hinreichend widerspruchsfrei erklären können. Eine Verbesserung der eindimensionalen Näherung der Potentialflächenanordnung läßt sich eventuell durch die Hinzunahme einer weiteren Dimension mithilfe der Theorie der konischen Durchschneidung erreichen.

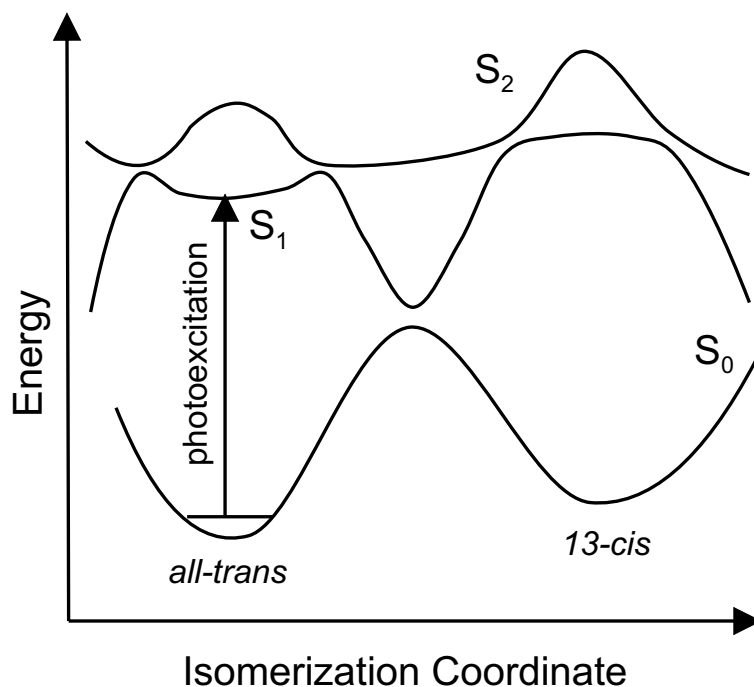


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Potentialflächen im drei-Zustandsmodell für die Photoisomerisation von BR nach [Has96].

3.2.2 Mehrdimensionale Modelle

3.2.2.1 Die konische Durchschneidung

Eine erste Erweiterung des oben vorgestellten eindimensionalen Modells läßt sich durch die Darstellung mithilfe vieldimensionaler Potentialflächen erreichen (siehe Abbildung 3.7) [Köp84, Man90]. Hierbei sind die S_1 und S_0 -Potentialflächen nicht mehr, wie im eindimensionalen Fall aufgespalten, sondern durch einen Reaktionsrichter miteinander verknüpft, der einen äußerst schnellen strahlungslosen Übergang von dem angeregten in den Grundzustand ermöglicht. Eine solche sogenannte konische Durchschneidung besteht im einfachsten Fall aus zwei nichtentarteten elektronischen Zuständen unterschiedlicher Symmetrie, die miteinander über eine einzige, nicht total symmetrische Mode wechselwirken, während eine zusätzliche symmetrische Mode die Energieaufspaltung der beteiligten Zustände moduliert [Köp84]. Der nächste Abschnitt soll die Theorie der konischen Durchschneidung kurz erläutern, genaueres findet sich in [Köp84, Sei94, Sei95].

Im Falle symmetrischer Wellenfunktionen eines zweiatomigen Moleküls, welches nur einen Freiheitsgrad besitzt, ist eine Kreuzung zwischen der S_0 - und S_1 -Potentialfläche nicht erlaubt (avoided-crossing). Im Fall der konischen Durchschnei-

ung ist der Kreuzungspunkt der Potentialflächen für symmetrische Zustände nicht vermieden, sondern die im einfachsten Fall zweidimensionalen S_1 - und S_0 -Potentialflächen schneiden sich an einem Punkt, in anderen Worten, sie sind an diesem Punkt entartet. Warum dieser Kreuzungspunkt für unsymmetrische Wellenfunktionen und große Moleküle erlaubt ist, soll im Folgenden erklärt werden:

Zur Beschreibung des Systems dienen zwei vollständige Sätze elektronischer Wellenfunktionen $\Phi_1(r,x)$ und $\Phi_2(r,x)$, wobei die Indizes 1 und 2 die jeweiligen elektronischen Zustände bezeichnen, der Parameter r steht für die Koordinaten der Elektronen, x für die Normalkoordinaten der Kerne. Die Wechselwirkung zwischen den elektronischen Wellenfunktionen geschieht über den Hamiltonoperator $H(x)$, der in erster Linie nur von der Molekülgeometrie abhängt. Es ergibt sich das Eigenwertproblem:

$$\begin{vmatrix} H_{11}(x) - E(x) & H_{21}(x) \\ H_{12}(x) & H_{22}(x) - E(x) \end{vmatrix} = 0 \quad (3.1)$$

mit

$$\int_{-\infty}^{\infty} \Phi_i^*(r,x) H(x) \Phi_j^*(r,x) dr = H_{i,j} \quad (3.2)$$

Unter der Bedingung, daß $H_{12}(x) = H_{21}(x)$ folgt daraus für die Energieeigenwerte:

$$E_{1,2}(x) = \frac{1}{2}(H_{11}(x) + H_{22}(x) \pm \sqrt{(H_{11}(x) - H_{22}(x))^2 + 4H_{12}^2(x)}) \quad (3.3)$$

Hierbei entspricht E_1 dem Energieeigenwert der Grundzustandspotentialfläche und E_2 dem Energieeigenwert der Potentialfläche des angeregten Zustandes. Damit sich nun beide Potentialflächen schneiden können, müssen $E_1(x)$ und $E_2(x)$ gleich sein. Wie man aus Gleichung 3.3 erkennen kann ist dies nur der Fall, wenn:

$$H_{11}(x) = H_{22}(x) \quad (3.4)$$

$$|H_{12}(x)| = 0 \quad (3.5)$$

Für zweiatomige Moleküle mit nur einem inneren Freiheitsgrad x und mit symmetrischen S_1 - S_0 -Zuständen ist es nie möglich, diese beiden Bedingungen gleichzeitig zu erfüllen, da $H_{12}(x)$ nur dann null wird, wenn die Wellenfunktionen verschiedene Symmetrien besitzen. Bei vielatomigen Molekülen, wie z.B. dem Retinal sollte es immer möglich sein, die Bedingungen aus Gleichung 3.5 gleichzeitig zu erfüllen [Sei94, Sei95]. Für ein N -atomiges Molekül können sich die Potentialflächen wegen der Bedingungen in Gleichung 3.5 entlang einer $N-2$ dimensional Hyperlinie schneiden. Es gibt an jeder Stelle der Hyperlinie zwei linear unabhängige Koordinaten (x_1, x_2) , die senkrecht zu dieser Hyperlinie gerichtet sind. Eine Bewegung entlang

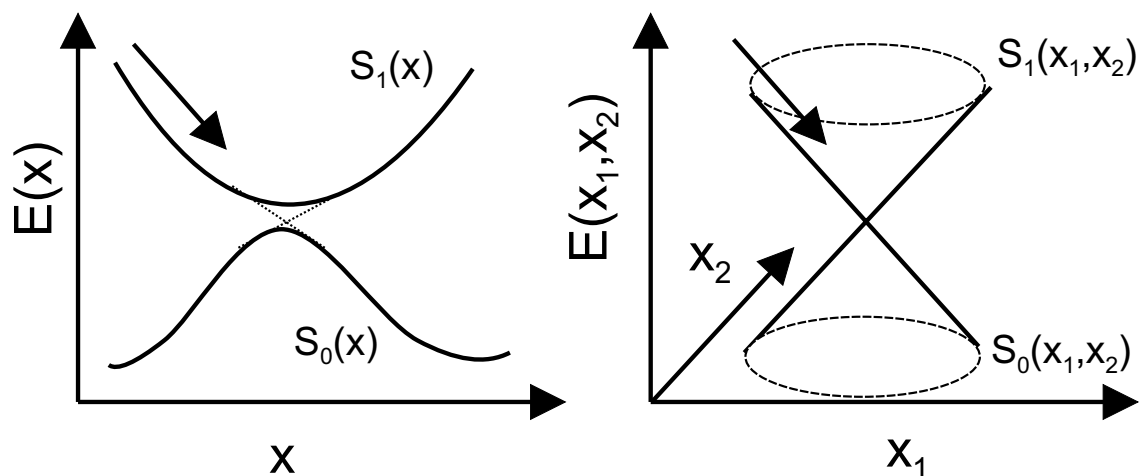


Abbildung 3.7: Vergleich zwischen eindimensionalen (links) und zweidimensionalen (rechts) adiabatischen Potentialflächen nach [Näg98].

dieser Koordinaten hebt sofort die Energieentartung auf. Trägt man die Energie der beiden Zustände entlang dieser beiden Koordinaten auf, so bilden die beiden Potentialflächen eine konische Durchschneidung. Der Punkt der konischen Durchschneidung ist der einzige, an dem die Energie der Zustände entartet ist (siehe Abbildung 3.9). Zur Beschreibung der Wellenpaketsdynamik innerhalb dieses Potentialkurvenmodells werden drei stark koppelnde Moden benötigt:

- eine Torsionsmode, die der Reaktionskoordinate der Isomerisierung in den eindimensionalen Modellen entspricht. Die Rotation des Retinals findet entlang dieser Koordinate statt, wobei eine Rotation um 180° einer Drehung von all-trans nach 13-cis (oder umgekehrt) entspricht, eine weitere Drehung um 180° führt zurück zum Ausgangszustand.
- eine Kopplungsmode X_c , die senkrecht zur Torsionsmode gerichtet ist. Entlang dieser Koordinate reduziert sich die Symmetrie der Zustände soweit, daß sich die Potentialflächen nur noch in einem Punkt schneiden.
- eine Franck-Condon aktive Tuningmode: diese wird durch die optische Anregung des Moleküls zum Schwingen gebracht, und ist für eine effiziente Umwandlung von elektronischer Energie in Schwingungsenergie der Kerne notwendig.

Die Tuningmode macht erst eine Dämpfung des Wellenpakets innerhalb der ersten Femtosekunden möglich, die für die Anpassung der Dynamik nötig ist [War91] und sie sorgt außerdem für den Energieaustausch zwischen Torsionsmode und Kopplungsmode. Erst durch die Dämpfung bleibt das Wellenpaket in einem der beiden Grundzustände (im Fall von BR: dem Ausgangszustand all-trans, oder dem Photo-

produkt 13-cis). Ergebnisse, die mithilfe der Theorie der konischen Durchschneidung für retinalhaltige Moleküle erzielt werden konnten, werden im nächsten Kapitel vorgestellt.

3.2.2.2 Theoretische Anwendung auf retinalhaltige Moleküle

In letzter Zeit wurden im Rahmen der Theorie der konischen Durchschneidung die Potentialflächen einiger retinalähnlicher Moleküle gerechnet. Im Folgenden sollen zwei Beispiele näher erläutert werden:

a) Garavelli et al. konstruierten mithilfe einer ab-initio quantenchemischen Simulation der Resonanzramanspektren von einem isolierten 11-cis protonierten Schiff-Base-Retinal (PSB11) die angeregte Potentialfläche und die darauf ablaufenden Reaktionen [Gar98]. Abbildung 3.8 zeigt den interessanten Teil der entsprechenden S_1 -Potentialfläche. PSB11 existiert im Grundzustand in einer planaren Struktur. Lichtanregung in die Franck-Condon-Region (FC) des ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 dieses Isomers führt zu einer Relaxation entlang der Potentialfläche. Diese Wellenpaketsbewegung im angeregten Zustand findet barriereelos statt, und verbindet die Franck-Condon-Region mit der konischen Durchschneidung (CI: conical intersection) zwischen der S_0 - und der S_1 -Potentialfläche. Von dort können die verschiedenen Photoprodukte gebildet werden. In diesem Bild ist ersichtlich, daß die erste Bewegung des Moleküls von einer reinen Gerüstschiwingung dominiert und keine Komponente in der Torsions- oder Out-of-Plane-Koordinate hat.

b) Eine erfolgreiche theoretische Anpassung der Femtosekundenmessungen an Rhodopsin gelang S. Hahn und G. Stock [Hah99]. Zwei Prinzipien liegen ihrer Berechnung zu Grunde:

i) Da die nichtadiabatische Kopplung am Schnittpunkt der beiden relevanten Potentialflächen singulär wird, ist der dazugehörige elektronische Übergang sehr schnell (im Bereich von einigen Femtosekunden) und daher sehr effizient.

ii) Typischerweise kann eine Potentialflächenkreuzung nur dann entstehen, wenn spezifische vibronisch aktive Schwingungsmoden dazu beitragen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß die hier beschriebene Isomerisierung modenselektiv ist, und daß das System korrekt beschrieben werden kann, indem man die richtigen an die Reaktion koppelnden Moden berücksichtigt. Ein Minimalmodell ausgehend von zwei elektronischen Zuständen, einer Reaktionskoordinate Φ und einer Kopplungsmoden X_C dient zur Beschreibung der Femtosekundenprozesse. Analog zu den Beobachtungen von Garavelli et al. gelang die Anpassung, indem als Kopplungsmoden die $C_{11}=C_{12}$ -

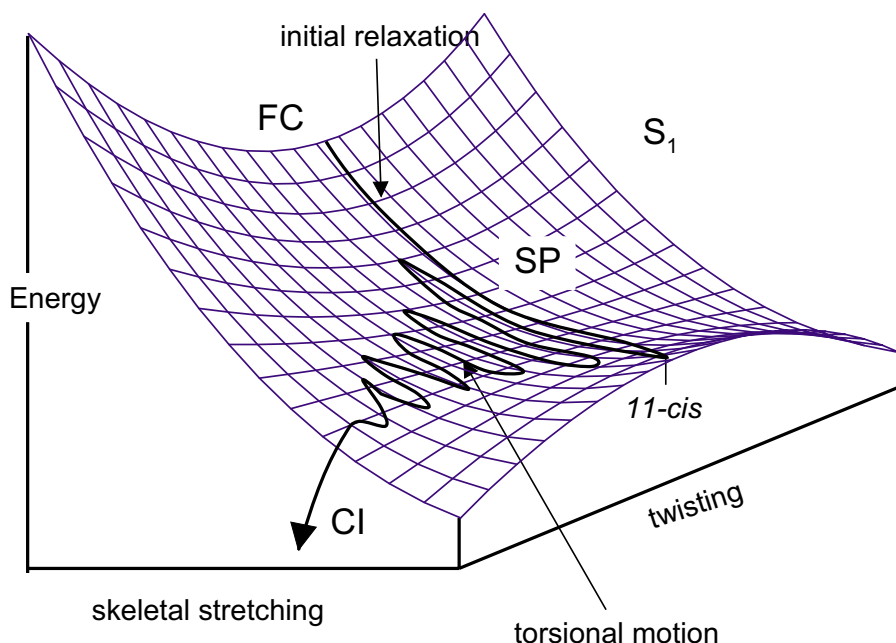


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der S_1 -Potentialfläche für ein Modell zur cis-trans Isomerisierung von PSB11. Die Anregung erzeugt ein Wellenpaket in der Franck-Condon-Region (FC), von dort relaxiert das Wellenpaket zu einem flachen Sattelpunkt (SP), wobei sich die Struktur des Retinals nicht ändert, auf dem Weg zur konischen Durchschneidung (CI) schwingt das Wellenpaket entlang der C=C-Streckschwingungskordinate [Gar98].

Streckschwingung¹ angenommen wurde. Hinzunahme einer weiteren Schwingungs-mode, z.B. der HOOP-Schwingung (hydrogen-out-of-plane) hatte keinen Einfluß auf die Dynamik der Reaktion. In dem von ihnen verwendeten diabatischen Ansatz setzt sich der molekulare Hamiltonoperator aus der kinetischen Energie T und der diabatischen Potentialmatrix V zusammen:

$$H = T \begin{vmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{vmatrix} + \begin{vmatrix} V_0 & V_{01} \\ V_{10} & V_1 \end{vmatrix}, \quad (3.6)$$

wobei die außerdiagonalen Matrixelemente nur von der Kopplungskordinate X_c abhängen. Die Diagonalelemente setzen sich aus zwei Termen zusammen:

$$V_{0,1} = V_{0,1}^R(\Phi) + V_{0,1}^C(X_C) \quad (3.7)$$

Zur Berechnung des Potentials entlang der Reaktionskoordinate wird folgender Ansatz verwendet:

$$V_0^R(\Phi) = \frac{1}{2}W_0(1 - \cos\Phi) \quad (3.8)$$

¹In Rhodopsin isomerisiert das Retinal von 11-cis nach all-trans.

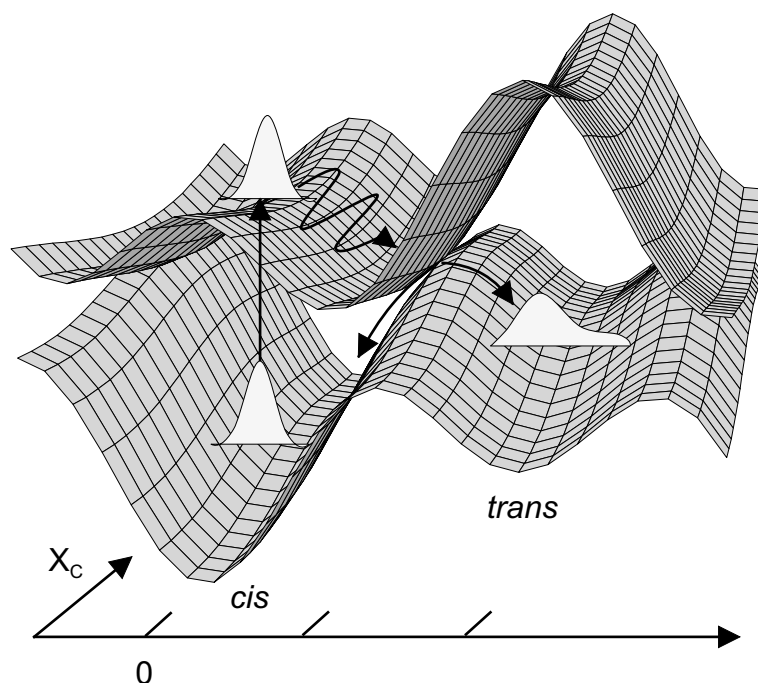


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung von adiabatischen Potentialflächen für ein Modell zur cis-trans Isomerisierung: gezeigt sind der Torsionswinkel Φ und die Kopplungskordinate X_C [Hah99].

$$V_1^R(\Phi) = E_1 - \frac{1}{2}W_1(1 - \cos\Phi) \quad (3.9)$$

Die Parameter E_1 , W_0 und W_1 sind gegeben durch die bei der Photoreaktion gespeicherte Energie $\Delta E = E_1 - W_1$ und unter Berücksichtigung der Zentralwellenlänge von cis und trans-Zustand. Mit diesen Annahmen konnten nicht nur die Quantenausbeute von Rhodopsin in Übereinstimmung mit den gemessenen Werten berechnet werden, sondern auch die starke Resonanzramanemission der C=C-Streckschwingung und die Existenz einer schwächeren Bande bei ca. 245 cm^{-1} richtig vorhergesagt werden. Vor allem die Femtosekundenmessungen an Rhodopsin mit einer Zeitauflösung unter 35 fs [Wan94] konnten mit diesem Modell hervorragend reproduziert werden. Detailliertere Angaben zu dem Modell und den Ergebnissen finden sich in [Hah99].

Obwohl die Isomerisierung in der Natur, sowie auch in chemischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, ist die theoretische Behandlung dieser interessanten Reaktion immer noch nicht eindeutig gelöst. Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, besteht noch keine Einigkeit über die Form der Potentialflächen, entlang derer die Reaktion abläuft. Die theoretischen Berechnungen im Rahmen der Theorie der konischen Durchschneidung legen entweder ein vereinfachtes Protein (isoliertes PSB11

im Modell von Garavelli et al.) zugrunde, berechnen nur Bewegungen auf der S_1 -Potentialfläche oder sind bisher nur für Rhodopsin gerechnet (Modell von Hahn und Stock). In Experimenten an einem BR-Analog, bei dem die $C_{13}=C_{14}$ -Bindung des Retinals blockiert ist, konnte ausgeschlossen werden, daß das Retinal im I-Zustand bereits wesentlich (ca. 90°) um die $C_{13}=C_{14}$ -Bindung isomerisiert ist (vollständige Isomerisierung beinhaltet eine Drehung um 180°) [Ye99a, Zho96], wohingegen in den meisten Modellen (siehe Abbildung 3.5) eine teilweise Isomerisierung im I-Zustand Voraussetzung ist. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente im Femtosekundenbereich sollten die vorgestellten eindimensionalen Modelle geprüft werden, und eventuell durch Erweiterung der Modelle ein konsistentes Reaktionsmodell vorgeschlagen werden. Die gute Zeitaufösung ermöglicht die Beobachtung von Wellenpaketsdynamik. Die Moden, die zur Erklärung der Wellenpaketsbewegung auf der S_1 -Potentialfläche im mehrdimensionalen Modell der konischen Durchschneidung bei PSB11 und Rhodopsin benötigt werden, können dabei mit den im Experiment an BR beobachteten Frequenzen verglichen werden.

Kapitel 4

Meßaufbau

Die in dieser Arbeit untersuchten Reaktionen finden auf einer Zeitskala zwischen 50 fs und einigen Pikosekunden statt. Diesen Zeitbereich erschließt man mit der Anreg-Abtast-Spektroskopie (engl: pump-probe). Dabei regt ein intensiver Anregimpuls der Wellenlänge λ_{pu} das Molekül an, ein zeitlich verzögerter, schwacher Abtastimpuls der Wellenlänge λ_{pr} tastet die Transmissionsänderung in der Probe als Funktion der Verzögerungszeit t_D ab. Die Voraussetzung für zeitabhängige Transmissionsmessungen ist die Erzeugung kurzer Lichtimpulse mit einer ausreichend hohen Impulsenergie und einer möglichst variablen Wellenlänge. Die Erzeugung der ultrakurzen Pulse erfolgt in Ti:Saphir-Laser-Oszillatoren. Ausreichend hohe Impulsenergien können durch regenerative Verstärkung der Pulse erreicht werden. Allerdings geht hier der Energiegewinn meist auf Kosten der Pulsdauer. Dies kann durch geeignete Frequenzkonversionsverfahren wieder wettgemacht werden. Durch die Entwicklung des nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkers stehen kurze Lichtimpulse (~ 15 fs) in einem weiten Wellenlängenbereich (450 nm–1000 nm) mit ausreichender Energie zur Verfügung. Dieses Kapitel soll einen Überblick über das Lasersystem, den nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärker und die damit verwirklichten Meßaufbauten liefern.

4.1 Ti:Saphirlaser-Oszillator und Verstärker

Zur Erzeugung und Verstärkung ultrakurzer Lichtimpulse benötigt man ein Lasermedium mit ausreichender Verstärkungsbandbreite, um dem Zeit-Bandbreiteprodukt $\Delta\nu\Delta t \simeq 1$ zu genügen. Aufgrund seiner breiten Fluoreszenzbande zwischen 700 nm und 1000 nm [Mou86], der großen mechanischen Festigkeit und guten Wärmeleitfähigkeit eignet sich ein mit Titanionen dotierter Saphirkristall (Ti:Saphir) her-

vorrangend als Lasermaterial in Oszillator und Verstärker. Obwohl der maximale Verstärkungsquerschnitt von Ti:Saphir bei 800 nm liegt, können Ti:Saphir Laser und Verstärker auch bei 860 nm betrieben werden, falls dies für bestimmte Experimente benötigt wird. (Ein Teil dieser Arbeit wurde an einem Lasersystem durchgeführt, dessen Zentralwellenlänge bei 870 nm lag, obwohl dies für die Messungen nicht entscheidend war.) Da die Absorptionsbande von Ti:Saphir von 400 nm bis 600 nm reicht, pumpt man den Laserkristall für den Oszillator typischerweise mit Argonionen-, für den Verstärker mit frequenzverdoppelten Nd:YAG bzw. Nd:YLF-Lasern [Agg88]. Die in Ti:Saphirlasern verwendete Modenkopplung zur Erzeugung ultrakurzer Lichtimpulse ist die sogenannte Kerrlinsen-Modenkopplung [Spi91]: durch den optischen Kerreffekt ist der Brechungsindex des Lasermaterials von der Lichtintensität abhängig. Die höheren Spitzenenergien im Impulsbetrieb führen deshalb zu einer Selbstfokussierung im Ti:Saphir-Kristall. Es ist daher möglich, den Resonator so zu konfigurieren, daß der Impulsbetrieb gegenüber dem Dauerstrichbetrieb bevorzugt wird. Da der Kerrlinseneffekt im Dauerstrichbetrieb zu schwach ist, die Impulsformung zu starten, dient als Startmechanismus ein longitudinal schwingender Resonatorendspiegel (R1). Abbildung 4.1 zeigt schematisch den Aufbau eines Ti:Saphirlaser-Oszillators.

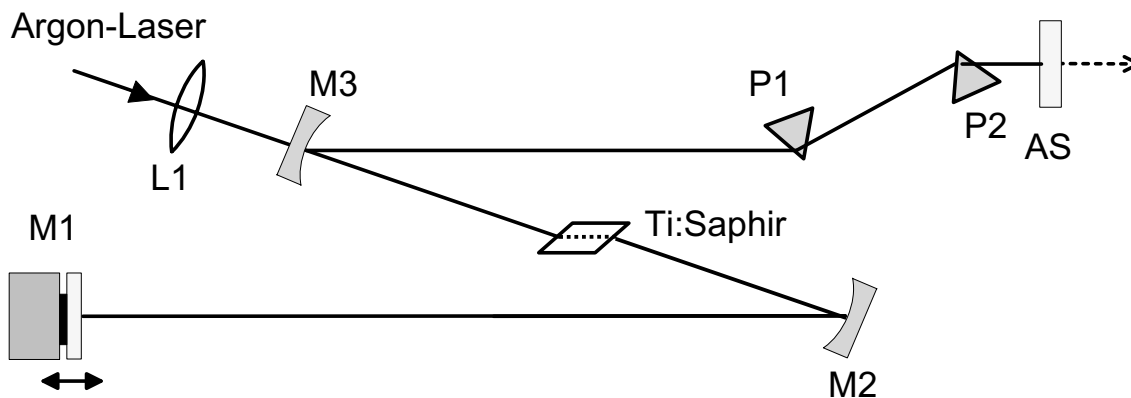


Abbildung 4.1: Aufbau eines Ti:Saphir-Laser-Oszillators [Hub97]: M1: longitudinal schwingender dielektrischer Resonatorendspiegel M2, M3: dielektrische Spiegel ($r = -100$ mm) AS: Auskoppelspiegel ($R = 92\%$) P1, P2: SF10-Prismen.

Die Intensität der so erzeugten Femtosekundenimpulse (typischerweise im Bereich von einigen nJ) ist zu gering, um ausreichend viele Moleküle anzuregen und Experimente bei verschiedenen Wellenlängen zu ermöglichen. In einem regenerati-

	Reaktionszentren	Bakteriorhodopsin
Zentralwellenlänge	860 nm	800 nm
spektrale Breite	14 nm	30 nm
Pulsdauer nach dem Verstärker	100 fs	60 fs
Wiederholrate	20 Hz	1 kHz
Impulsenergie	600 μ J	300 μ J

Tabelle 4.1: Die wichtigsten Parameter der verwendeten Lasersysteme.

ven Verstärker (Abbildung 4.2) werden deshalb die Impulsenergien um ca. 5 Größenordnungen erhöht. Da durch den Verstärkungsprozeß Impulsenergien bis über 1 mJ erreicht werden können, muß darauf geachtet werden, daß empfindliche optische Komponenten im Verstärkeraufbau nicht zerstört werden. Zur Vermeidung zu hoher Spitzenintensitäten werden die Impulse vor dem Verstärkungsprozeß in einem „Expander“ auf einige 100 ps verlängert, indem die Pulse optische Komponenten mit positiver Gruppengeschwindigkeitsdispersion durchlaufen, und somit die spektralen Komponenten des Pulses gegeneinander verzögert werden („Chirp“). Der gechirpte Laserpuls (Seedimpuls) wird dann in einen Resonator eingekoppelt, dessen Ti:Saphir Laserkristall zeitlich unmittelbar vor der Einkopplung mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG- oder Nd:YLF-Laser gepumpt wurde. Die so im Kristall entstandene Besetzungsinversion wird durch mehrere Umläufe vom Seedimpuls abgebaut. Nach der Verstärkung wird der Chirp durch eine Anordnung mit negativer Gruppengeschwindigkeitsdispersion wieder kompensiert. Da Terme höherer Ordnung der Dispersion, die beim Durchgang durch einige optische Komponenten entstehen, nicht restlos kompensiert werden können, sind die Pulse nach der Verstärkung meistens etwas länger als vorher. Die Daten der verwendeten Systeme für die Messungen an Reaktionszentren sowie an Bakteriorhodopsin können Tabelle 4.1 entnommen werden. Die hier verwendeten Ti:Saphir Lasersysteme erzeugen kurze Lichtimpulse mit Zentralwellenlängen von 800 nm bzw. 860 nm. Die benötigten Wellenlängen für die Spektroskopie an biologischen Molekülen ergeben sich aus den Absorptions- bzw. Emissionsspektren der zu untersuchenden Moleküle. Für den energetisch vergleichsweise schwachen Abtastimpuls reichte es bei den Untersuchungen an den Reaktionszentren aus, durch Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation in einer Saphirscheibe ein Weißlichtkontinuum zu generieren [For83]. Aus diesem wird dann mittels eines Gitterspektrometers die gewünschten Abtastwellenlängen selektiert. Die für den Anregungsimpuls benötigten Impulsenergien bei verschiedenen Wellenlängen

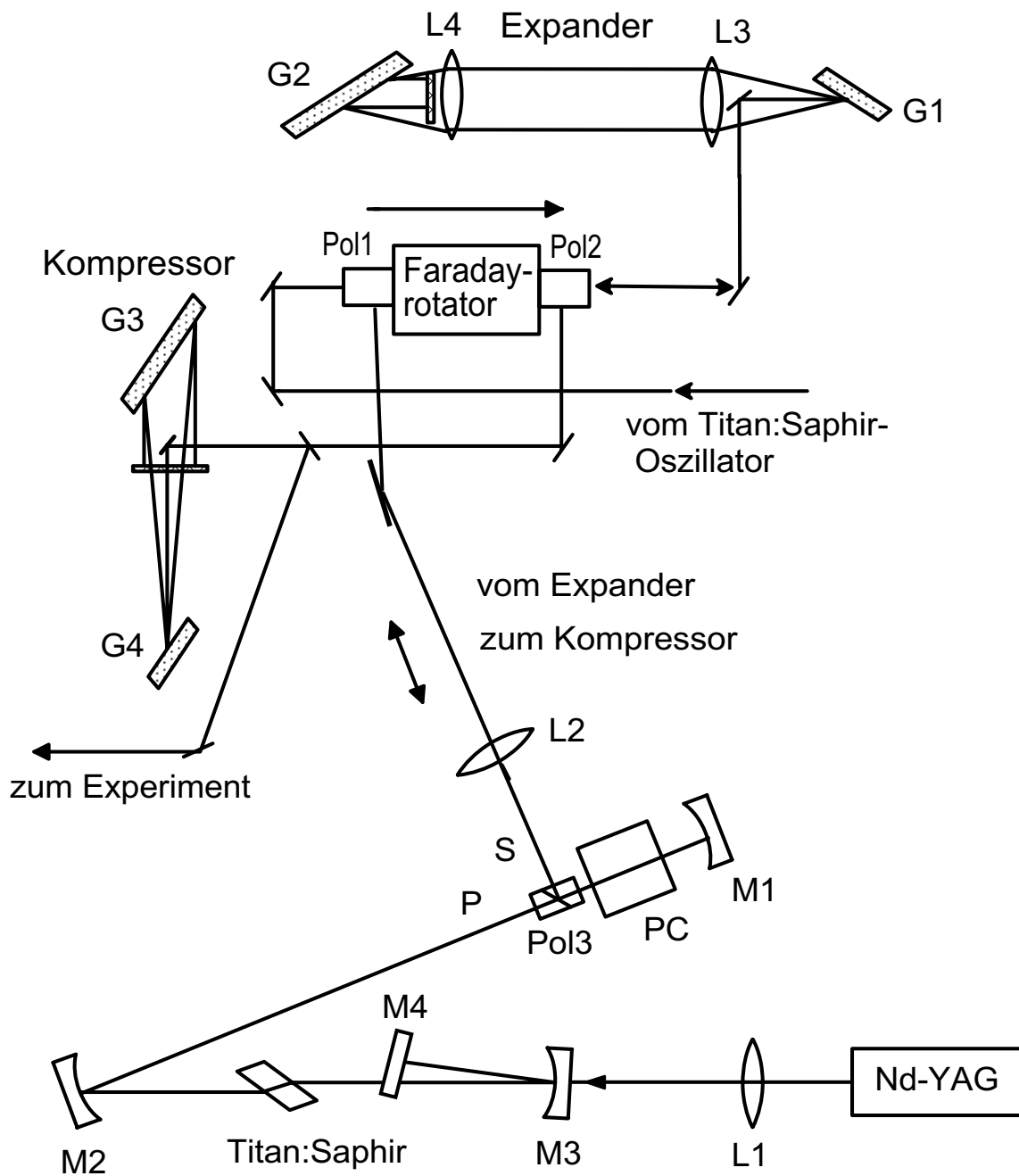


Abbildung 4.2: Beispiel für den Aufbau eines Verstärkers [Hub97] mit Expander, Kompressor und Resonator: M1 - M3: gekrümmte dielektrische Spiegel M4: Planspiegel L1 - L4: konvexe Linsen G1 - G4: Gitter PC: Pockelszelle in Kombination mit Pol3 (Polarisator) zur Ein- und Auskopplung der Lichtimpulse.

im Sichtbaren und nahen Infrarot können durch die Technik der nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkung erzeugt werden [Wil98].

4.2 Nichtkollinearer optisch parametrischer Verstärker

Die Bereitstellung durchstimmbarer Lichtimpulse bei gleichzeitig kurzer Pulsdauer stellte in der Vergangenheit große Probleme dar. Bis vor wenigen Jahren wurden die kürzesten Pulse mit Farbstofflasersystemen erzeugt: zwar konnten durch die relativ breiten Emissionsspektren der Farbstoffe spektral breite Pulse erzeugt, und durch die Wahl der Laserfarbstoffe verschiedene Frequenzen ausgewählt werden, doch führten das notwendige Durchpumpen und die Alterungsprozesse der Farbstoffe zu verminderter Laserstabilität. Fortschritte konnten in diesem Bereich durch den Einsatz von stabileren Festkörperlasern erzielt werden, deren relativ hohe Intensitäten im Pulsbetrieb Frequenzkonversion in nichtlinearen optischen Kristallen ermöglichen. Durch die hohen Feldstärken ist die Polarisierung nicht mehr linear von der elektrischen Feldstärke E abhängig, sondern eine komplexere Funktion:

$$P = \chi_1 E + \chi_2 E^2 + \chi_3 E^3 + \dots \quad (4.1)$$

Bei Einstrahlung einer intensiven Welle der Frequenz ω in ein nichtlineares Medium entsteht unter der Voraussetzung $\chi_2 \neq 0$ eine Welle der Frequenz 2ω . Überlappt man zwei Wellen der Frequenzen ω_1 und ω_3 in einem nichtlinearen Kristall, so kann wieder unter der Bedingung $\chi_2 \neq 0$ eine Welle der Frequenz

$$\omega_2 = \omega_3 \pm \omega_1 \quad (4.2)$$

erzeugt werden (Summen- bzw. Differenzfrequenzerzeugung) [Ber93]. Die Intensität des so erzeugten Lichtes ist proportional zu der Wechselwirkungslänge im Kristall, in der die Wellen phasenrichtig überlappen. Das bedeutet, daß für eine effiziente Wellenlängenkonversion der Kristall ausreichend dick sein muß. Da der Brechungsindex in transparenten Medien im sichtbaren Spektralbereich streng monoton steigend von der Frequenz abhängt (Bereich normaler Dispersion), ist die Phasengeschwindigkeit von niederfrequenten Wellen im Kristall höher als die von höherfrequenten Wellen. Nach kurzen Strecken im Kristall sind dann die verschiedenen Wellen nicht mehr in Phase und der Konversionsprozeß bricht ab. Zur Vermeidung von destruktiver Interferenz im Kristall und damit einhergehenden Konversionsverlusten zwischen früher und später erzeugten Wellen müssen die Phasengeschwindigkeiten der am nichtlinearen Prozeß beteiligten Wellen aneinander angepaßt werden (Phasenanpassung).

$$\Delta k = k_3 - k_2 - k_1 = 0 \quad (4.3)$$

Im einfachsten Fall der Frequenzverdopplung kann dies in doppelbrechenden Kristallen erreicht werden, indem eine Welle außerordentlich polarisiert ist und der Phasenanpassungswinkel so gewählt wird, daß der Brechungsindex der ordentlich polarisierten Welle $n_o(\omega)$ gleich dem Brechungsindex der außerordentlich polarisierten Welle $n_e(2\omega)$ ist.

Bei der optisch parametrischen Verstärkung (OPA: optical parametric amplifier) nützt man den Effekt der Differenzfrequenzerzeugung aus. Eine energiereiche, außerordentlich polarisierte „pump“-Welle bei einer Frequenz ω_3 wird im Kristall mit einer schwächeren Welle der Frequenz ω_1 (im Folgenden „signal“) überlappt. Durch die Nichtlinearität kann eine Vielzahl neuer Frequenzen entstehen, z.B. $2\omega_3$, $2\omega_1$, $\omega_3 - \omega_1$. Jetzt wählt man den Phasenanpassungswinkel so, daß nur die Welle der Frequenz $\omega_2 = \omega_3 - \omega_1$ entsteht (im Folgenden „idler“). Die Intensität dieser Idlerwelle steigt über die ganze Kristalllänge auf Kosten der Intensität der Pumpwelle an. Dabei nimmt aber auch die Intensität der Signalwelle zu. Da aus der Energieerhaltung (Gleichung 4.2) folgt, daß jedes Pumpphoton in ein Signalphoton und ein Idlerphoton zerfällt, muß das Pumpphoton höherenergetisch als die beiden anderen sein.

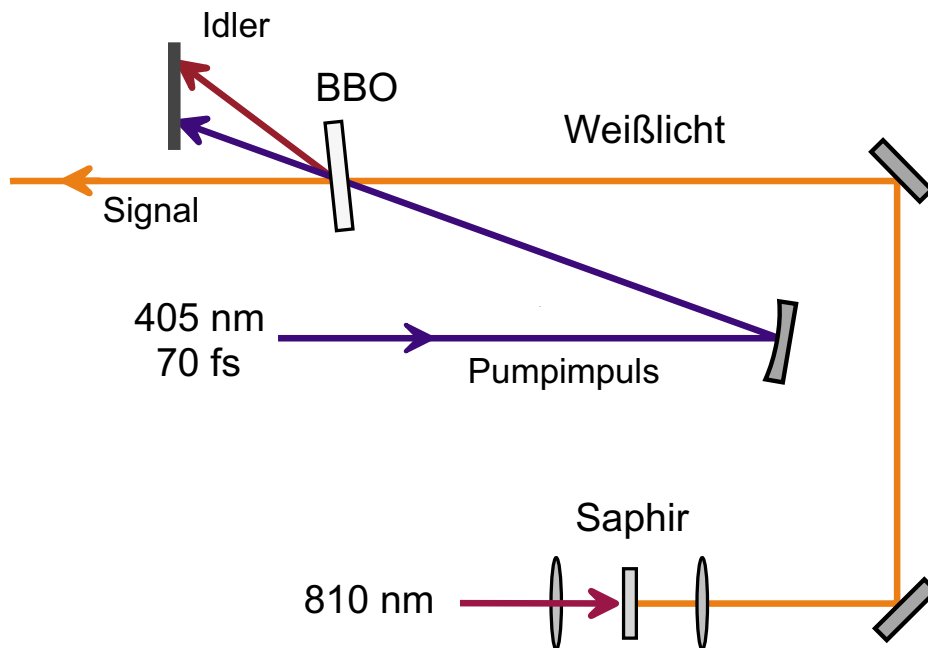


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung eines NOPA (noncollinear optical parametric amplifier). In einem NOPA-Kristall (BBO) werden die Seedimpulse (Weißlicht) mit den frequenzverdoppelten Pumpimpulsen überlappt. Es entstehen spektral variierbare Signal- und Idlerimpulse.

Will man Signalphotonen im sichtbaren Spektralbereich erhalten, muss deshalb die Frequenz ω_3 des Pumpphotons kurzweilig von der gewünschten Signalwellenlänge liegen, was z.B. durch Frequenzverdopplung der Grundwellenlänge der verwendeten Lasersysteme erreicht werden kann. Um die breiten Spektren, die zur Erzeugung kurzer Pulse benötigt werden, zur Verfügung zu stellen, wird durch Selbstphasenmodulation in einer dünnen Saphirscheibe aus der Fundamentalen bei 800 nm (bzw. 860 nm) ein Weißlichtkontinuum erzeugt. Dieser Weißlichtimpuls ist gechirpt, das heißt, die langwelligeren Komponenten kommen zeitlich vor den kurzwelligeren Komponenten im OPA-Kristall an. Durch eine Verzögerungsstrecke im Aufbau können gezielt bestimmte spektrale Teile des Weißlichtkontinuums mit den Pumpimpuls ω_3 im Kristall zeitlich überlappt und somit verstärkt werden, und spektral breite Signalimpulse entstehen. In einem kollinearen Aufbau, wie er bisher üblich war, konnten nur spektral schmale Signalimpulse erzeugt werden, die durch unterschiedliche Gruppengeschwindigkeit von Signal- und Idlerwelle im Kristall nicht vollständig komprimierbar waren und so eine minimale Pulsdauer von ca. 50 fs aufwiesen. Der entscheidende Durchbruch kam mit der Entwicklung des nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkers (NOPA: noncollinear optical parametric amplifier) [Wil98, Gal95, Hac96, Pie98, Wil97] (siehe Abbildung 4.3). Wählt man die Anordnung so, daß Signalwelle und Pumpwelle unter einem Winkel Ψ im Kristall aufeinander treffen, so folgt aus der Impulserhaltung, daß die Idlerwelle unter einem Winkel Ω zur Signalwelle erzeugt wird (siehe Abbildung 4.4a).

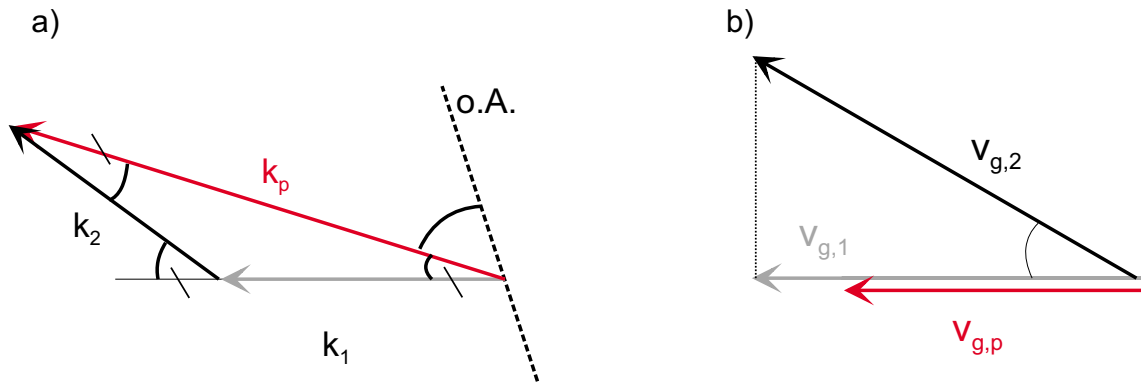


Abbildung 4.4: Wellenvektoren k_i und Gruppengeschwindigkeiten $v_{g,i}$ im Fall einer nichtkollinearen Phasenanpassung nach [Wil98]: o.A.: optische Achse im Kristall, Ψ : Winkel zwischen Pump- und Signalimpulsen, Ω : Winkel zwischen Signal- und Idlerimpulsen, Φ : Phasenanpassungswinkel.

Der Winkel Ψ zwischen Signal- und Pumpwelle muß so gewählt werden, daß die Projektion der Gruppengeschwindigkeit der Idlerwelle auf die Signalwelle gleich der Gruppengeschwindigkeit der Signalwelle ist (siehe Abbildung 4.4b). Dieses intuitive Bild kann auch rechnerisch hergeleitet werden [Wil98, Pie98]. Um die Bedingung für spektral breite Signalimpulse zu erhalten, muß die Phasenfehlanpassung Δk der Wellenvektoren nach der Verstimmung der Seedwellenlänge $\Delta\lambda_1 = \lambda - \lambda_1$ entwickelt werden:

$$\Delta k = \Delta k_0 + \frac{\partial \Delta k}{\partial \lambda_1} \Delta \lambda_1 + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \Delta k}{\partial \lambda_1^2} \Delta \lambda_1^2 + \dots \quad (4.4)$$

Die Bedingung $\Delta k_0 = 0$ wird durch Einstellen der Phasenanpassung im Kristall erfüllt. Für effiziente breitbandige Verstärkung muss allerdings auch der Term $\frac{\partial \Delta k}{\partial \lambda_1}$ verschwinden. Berechnung dieses Terms [Wil98] liefert die Gleichung

$$v_{g,1} = \cos(\Omega) * v_{g,2} \quad (4.5)$$

Durch eine Anpassung der Gruppengeschwindigkeiten kann also eine breitbandige Verstärkung gewährleistet werden. Die Tatsache, daß die Gruppengeschwindigkeiten von Signal- und Idlerwelle in Richtung der Signalwelle, in der die Verstärkung stattfindet, gleich sind, bedeutet, daß im Gegensatz zur kollinearen Anordnung keine Impulsverlängerung durch ein Auseinanderlaufen von Signal- und Idlerwelle stattfindet.

4.3 Meßmethode: Anreg-Abtastspektroskopie

Durch die oben beschriebenen Prozesse stehen nun abstimmbare ultrakurze Lichtimpulse im Sichtbaren und nahem Infrarot zur Verfügung. Diese ermöglichen die Untersuchung extrem schneller Reaktionen, wie z.B. den Elektronentransfer in photosynthetischen Reaktionszentren und die Isomerisierung von Bakteriorhodopsin. Ein energiereicher Anregungsimpuls wird zum Starten eines Prozesses in die Probe fokussiert. Findet eine Reaktion, z.B. Elektronentransfer von einem Donor- zu einem Akzeptormolekül oder eine Isomerisierung statt, verändern sich die Absorptionseigenschaften der Probe (Absorbance) im Lauf der Zeit. Mit einem wesentlich schwächeren Abtastimpuls, der zeitlich verzögert auf die Probe trifft, wird die Transmission des entsprechenden Probenvolumens als Funktion der Verzögerungszeit t_D und der Abtastwellenlänge λ_{pr} nachgewiesen. Der Zusammenhang zwischen Absorbance A und Transmission T ist folgendermaßen definiert:

$$T(\lambda_{pr}, t_D) = 10^{-A(\lambda_{pr}, t_D)} \quad (4.6)$$

Grund für die Absorptionsänderung der Probe ist die zeitlich veränderte (transiente) Besetzung verschiedener Zustände, angefangen von der Entvölkerung des Grundzustandes durch den Anregungsimpuls bis zur Besetzung des Endzustandes. Die Zustände werden im Folgenden mit I_i bezeichnet, wobei $i=0$ den Grundzustand und $i=1, 2, \dots$ alle weiteren Zustände in der Reihenfolge ihrer Besetzung bezeichnet. Die einfachste Möglichkeit, transiente Absorptionsänderungen in Molekülen zu beschreiben, ist ein Ratengleichungsmodell, in dem die Besetzung bzw. Entleerung der beteiligten Zustände durch exponentielle Zerfälle angepaßt wird. Dieses Ratenmodell ist allerdings nur für den Fall gültig, daß die Relaxationszeiten innerhalb der Zustände klein gegenüber den Reaktionszeiten zwischen den Zuständen sind, in anderen Worten, daß der jeweilige Ausgangszustand im thermischen Gleichgewicht ist. In dieser Arbeit wurden Reaktionen untersucht, die so schnell sind, daß diese Annahme sicher nicht gerechtfertigt ist. Daher wurde das Ratengleichungsmodell für diese Reaktionen nur als erste Näherung verwendet.

Die Anpassung der Meßdaten nach dem Ratengleichungsmodell erfolgt mit einer Summe von Exponentialfunktionen $exp(-t_D/\tau_j)$ gewichtet mit den Amplituden a_j .

$$\Delta\tilde{A}(\lambda_{pr}, t_D) = \sum_{j=0}^n a_j(\tau_j, \lambda_{pr})exp(-t_D/\tau_j) \quad (4.7)$$

Berücksichtigt man die zeitliche Breite der Impulse, muß die Gleichung noch mit der Apparatfunktion K (normierte Kreuzkorrelation) aus Anregungs- und Abtastimpuls gefaltet werden:

$$\Delta A(\lambda_{pr}, t_D) = \int_0^\infty \sum_{j=0}^n a_j(\tau_j, \lambda_{pr})exp(-t_D/\tau_j)K(t_D - t')dt' \quad (4.8)$$

Mit dieser Modellfunktion werden die Meßkurven angepaßt, um die Zerfallszeiten der einzelnen Zustände zu bestimmen. Messungen mit sehr hoher Zeitaufösung zeigen allerdings oft nicht-exponentielles Verhalten. Dem exponentiellen Zerfall sind Oszillationen überlagert, die die Wellenpaketsbewegung darstellen. Zum Anpassen dieser Oszillationen wurde die Modellfunktion (Gleichung 4.8) um einen oszillierenden Term o erweitert:

$$o = a_{osz}cos(\omega t' + \phi)exp(-\frac{t_D}{\tau_i}) \quad (4.9)$$

wobei ω die Oszillationsfrequenz, ϕ die Phase, a_{osz} die Amplitude und τ_i die Dämpfung der Oszillation bedeuten. Die zu den so bestimmten Zerfallszeiten gehörende Ratenmatrix (siehe z.B. [Dre91a]) enthält als Matrixelemente die Übergangsraten zwischen den einzelnen Zuständen, wobei $k_{mn} = 1/\tau_{mn}$ der Rate des Übergangs vom Zustand n zum Zustand m entspricht.

Die im Folgenden (Kapitel 5 und 6) vorgestellten zeitaufgelösten Messungen wurden mittels der Anreg- Abtastspektroskopie gewonnen. Da die biologischen Systeme und die untersuchten Fragestellungen unterschiedliche Anforderungen an die Meßaufbauten stellten, wurden die Messungen an verschiedenen Meßsystemen durchgeführt.

4.4 Meßaufbau für die Untersuchungen an Reaktionszentren

Erste temperaturabhängige Messungen an der Mutante L168HF von *Rps. viridis* zeigten eine starke Beschleunigung der Elektronentransferrate bei tieferen Temperaturen [Zin98]. Allerdings lag die schnellste gemessene Elektronentransferzeit (250 fs) an der damaligen Grenze der Zeitauflösung des Systems ($KK = 300$ fs). Außerdem wurden Oszillationen im Bereich der stimulierten Emission von P^* an Reaktionszentren von *Rhodobacter sphaeroides* [Spö98, Vos98, Vos93, Vos94, Vos96, Vos91] beobachtet. Spekulationen, ob diese Oszillationen ein erster Hinweis für eine an den Elektronentransfer koppelnde Wellenpaketsbewegung sind, konnten weder bestätigt noch widerlegt werden. Es sollte daher untersucht werden, ob ähnliche Oszillationen an Reaktionszentren von *Rps. viridis* beobachtet werden können. Dafür benötigte man eine Zeitauflösung besser als 100 fs. Für die geplanten temperaturabhängigen Messungen erwies sich ein Meßsystem mit niedriger Repetitionsrate als vorteilhaft, da die Probe bei tiefen Temperaturen nicht mehr zwischen den Laserschüssen ausgetauscht werden kann. (Um eine Akkumulation von Photoprodukten und langlebigen Zuständen zu verhindern, muß gewährleistet sein, daß die Probe bei jeder neuen Anregung wieder im Grundzustand ist.) Abbildung 4.5 zeigt den Meßaufbau für die Messungen an den Reaktionszentren. Für den Anregungsimpuls wurde ein NOPA bei 970 nm betrieben. Nach der Kompression der Impulse durch einen Prismenkompressor (PK), bestehend aus zwei SF10 Prismen, ergibt sich die Autokorrelationsbreite der Anregungsimpulse zu 40 fs. Zur Erzeugung der Abtastimpulse wurde die Fundamentale des Laser-Verstärkersystems bei 860 nm in eine Saphirscheibe (WL) fokussiert. Aus dem durch Selbstphasenmodulation entstandenen Weißlichtkontinuum wird mit Hilfe eines Gitterspektrometers die gewünschte Abtastwellenlänge selektiert. Das Gitterspektrometer besteht aus einer Anordnung aus vier Gittern, die so aufgebaut sind, daß bei der Wellenlängenselektion auch eine Pulskompression stattfindet [Spö97]. Die Autokorrelation der so entstandenen Abtastimpulse ergibt sich zu etwa 80 fs. Zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses wird ein Teil

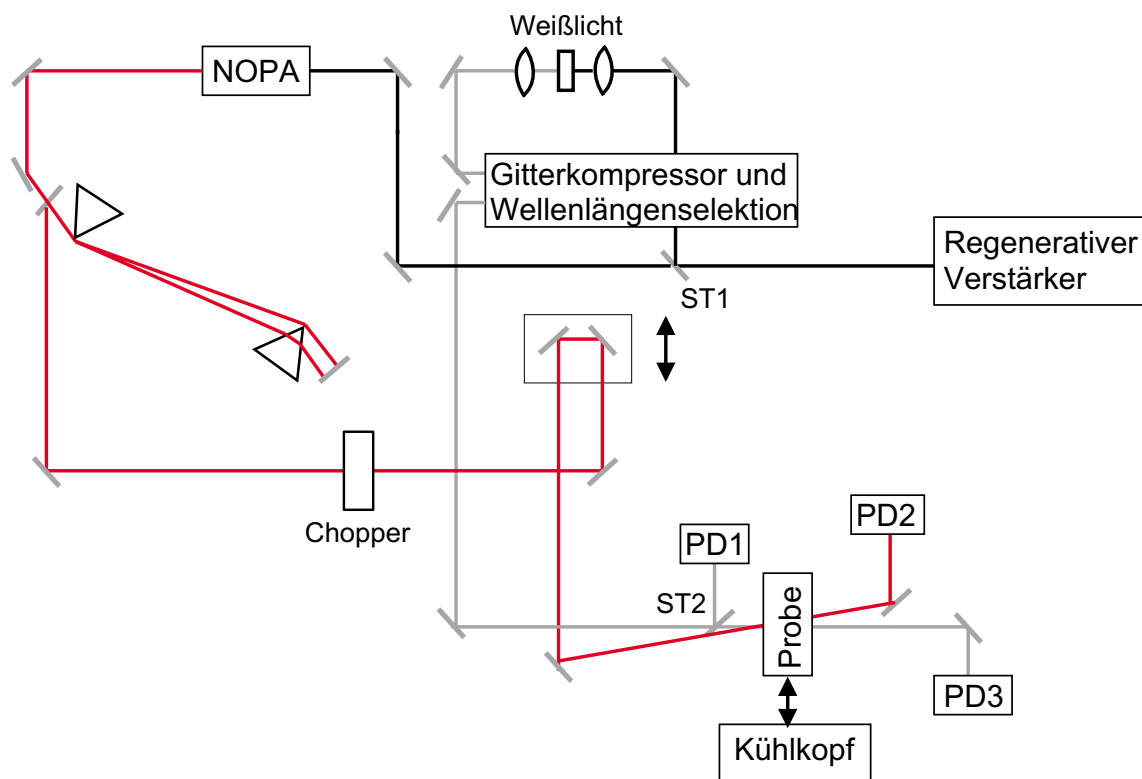


Abbildung 4.5: Meßaufbau für die Messungen an den Reaktionszentren ST: Strahlteiler, NOPA: nichtkollinearer optisch parametrischer Oszillator, PK: Prismenkompressor, WL: Weißlichterzeugung in Saphirscheibe, PD1: Referenzdiode, PD2: Anregungsdiode, PD3: Abtastdiode.

des Abtastlichtes vor der Probe mit einem Strahlteiler (ST) abgezweigt und als Referenz auf einen Detektor gegeben. Der andere Teil des Abtastlichtes wird in der Probe mit der, über eine optische Verzögerungsstrecke zeitlich verzögerten, Anregung überlagert. Eine weitere Verbesserung des Meßsignals wird dadurch erzielt, daß der Anregungsimpuls mit einem Chopper geblockt werden konnte und so Meßwerte mit und ohne Anregungsimpuls aufgenommen werden konnten. Dadurch kann eine langsame Drift des Meßsignals aufgrund von Schwankungen des Lasersystems aus dem Meßsignal eliminiert werden. So konnte eine Auflösung in der Größenordnung von 0.1% und eine Kreuzkorrelationsbreite von 90 fs bei einer Anregungswellenlänge von 970 nm und Abtastwellenlängen zwischen 1020 nm und 1100 nm erzielt werden. Bei den Raumtemperaturmessungen wird die Probe in eine 1 mm dicke Quarzküvette gefüllt und mit einem Magnetrührer umgerührt. Für die Tieftemperaturmessungen wird der Probenhalter gegen den Kühlkopf eines Heliumkryostaten ausgetauscht.

4.5 Meßaufbau für die Messungen an Bakteriorhodopsin

Im Gegensatz zu den Messungen an den Reaktionszentren stand beim Aufbau des BR-Meßplatzes im Vordergrund, die bestmögliche Zeitauflösung zu erreichen, und den Zeitnullpunkt (an dem Anregungs- und Abtastimpuls gleichzeitig im Probenvolumen aufeinandertreffen) möglichst genau zu bestimmen. Zur Zeitnullpunktbestimmung wurde direkt am Probenort vor und nach jeder Messung eine Kreuzkorrelation aufgenommen.

4.5.1 Meßaufbau

Bei den Bakteriorhodopsinmessungen wurde sowohl der Anregungs- als auch der Abtastimpuls von einem NOPA erzeugt (siehe Abbildung 4.6). So waren beide Wellenlängen getrennt über einen weiten Spektralbereich (480 nm bis 1000 nm) abstimmbar. Komprimiert wurden beide Impulse einzeln über je einen Prismenkompressor aus Quarzprismen. Will man die beste Zeitauflösung am Meßplatz erreichen, so ist es notwendig, Anregungs- und Abtastimpuls am Meßort bestmöglich komprimiert zu haben. Jeder weitere Glasdurchgang nach der Autokorrelationsmessung würde die Pulse wieder verlängern und damit die Zeitauflösung der Experimente verschlechtern. Es wurde deshalb ein Meßplatz aufgebaut, bei dem am Probenort die Autokorrelationen der Anregungs- und Abtastimpulse, sowie die Kreuzkorrelation gemessen werden kann (siehe Abbildung 4.6). Um polarisationsabhängige Messungen durchführen zu können und gleichzeitig die Energie des Abtastimpulses regeln zu können, befindet sich im Abtastzweig eine Kombination aus $\lambda/2$ -Plättchen und Polarisator. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wird ein Teil des Abtastlichtes vor der Probe abgetrennt und auf einen Referenzdetektor gegeben. Im Anregungszweig befindet sich ein Chopper, der bewirkt, daß die Probe nur bei jedem zweiten Schuß angeregt wird. Das aufgenommene Meßsignal setzt sich dann wie folgt zusammen:

$$\frac{T}{T_0} = \frac{q_{hell}/q_{dunkel}}{ref_{hell}/ref_{dunkel}} \quad (4.10)$$

wobei q_{hell} bzw. q_{dunkel} die Anzahl der Photonen mit bzw. ohne Anregung auf der Abtastphotodiode, und ref_{hell} bzw. ref_{dunkel} die entsprechende Anzahl der Photonen auf dem Referenzdetektor darstellen. Der Anregungsimpuls und der Abtastimpuls treffen in der Probe unter einem Winkel von ca. 3 Grad aufeinander. Der Meßplatz ist so konstruiert, daß Proben in verschiedenen Küvetten und im Freistrahlgemes-

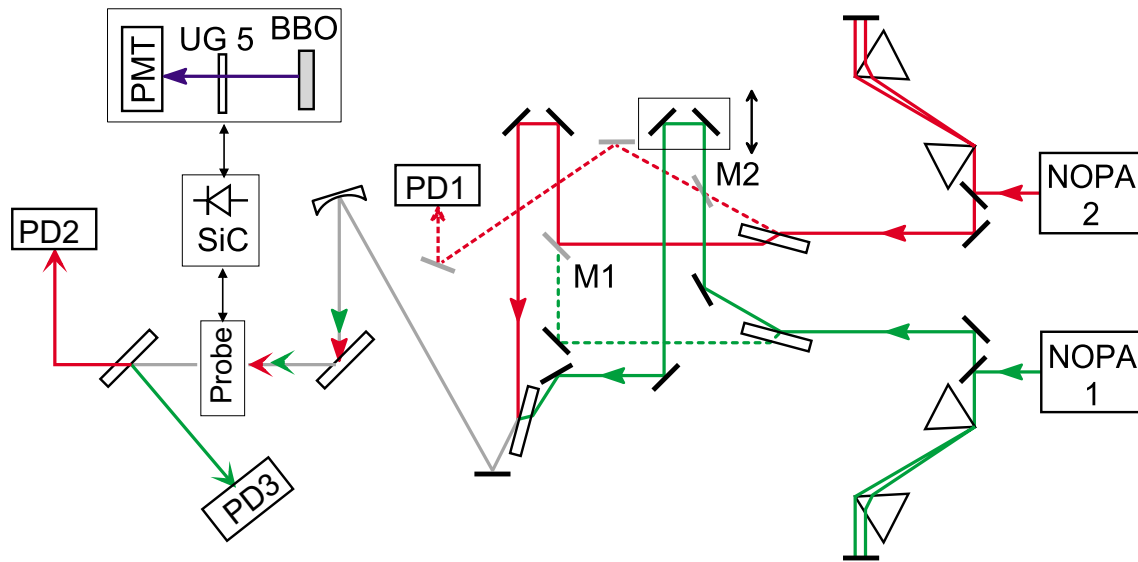


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Meßaufbaus für die Messungen an BR. M1, M2: Silberspiegel auf Repositionierplatten, PMT: Photomultiplier PD1: Referenzdiode, PD2: Abtastdiode, PD3: Anregungsdiode.

sen werden können. „Rührküvetten“ haben zwar den Vorteil, daß nur eine relativ geringe Probenmenge benötigt wird. Um einen Magnetrührer in der Küvette bewegen zu können und damit das Probenvolumen auszutauschen, muß die Küvette allerdings mindestens 1 mm Schichtdicke aufweisen. Je weiter die Wellenlängen von Anregungs- und Abtastimpuls auseinander liegen, desto mehr verschlechtert dabei die Gruppengeschwindigkeitsdispersion in der Probe die Zeitauflösung. Es ist daher ratsam, Experimente mit hoher Zeitauflösung in möglichst dünnen Schichtdicken durchzuführen. Für die Messungen in dieser Arbeit wurden deshalb Durchflußküvetten mit einer Schichtdicke von $250\ \mu\text{m}$ verwendet, die einen Probenaustausch mit Hilfe einer Pumpe erforderten.

4.5.2 Kreuzkorrelationsmessungen

Die bisher übliche Korrelationsbreitenmessung basierte auf dem Prinzip der phasenangepaßten Frequenzverdopplung in einem nichtlinearen Kristall. In einem Autokorrelator wurde der zu messende Puls geteilt, ein Teil wurde über eine variable Verzögerungsstrecke geführt. In einem nichtlinearen Kristall wurden die beiden Strahlen unter einem Winkel θ überlappt (Bei $\theta = 0$ wird die interferometrische Autokorrelation, sonst die Intensitätsautokorrelation gemessen). Die verwendeten Kristalle waren üblicherweise $100\ \mu\text{m}$ dicke BBO- oder KDP-Kristalle. Für sehr kur-

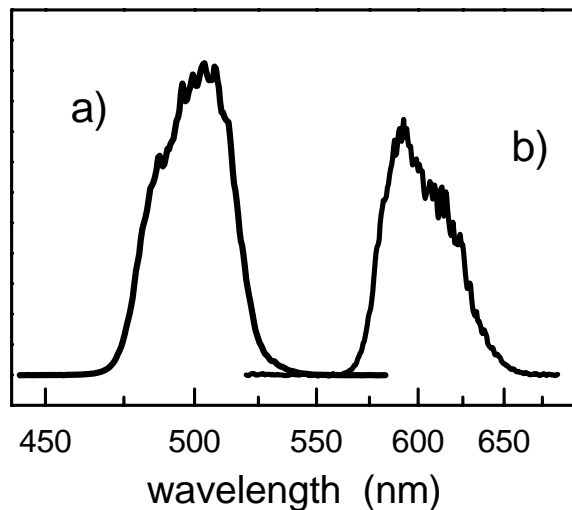


Abbildung 4.7: Spektren der Pulse bei a) 500 nm (NOPA I) b) 600 nm (NOPA II).

ze Pulse ($\tau \approx 10$ fs) ist es allerdings notwendig, dünnere Kristalle zu verwenden, um die zusätzliche Dispersion und die Phasenfehlانpassung zwischen der Fundamentalen und der erzeugten zweiten Harmonischen zu minimieren [Ran97]. Für die zeitlich kurzen, aber zwangsläufig spektral sehr breiten Pulse kann die Phasenfehlانpassung in dickeren Kristallen zu einem spektralen Filtereffekt führen, und die Messungen können signifikant verfälscht werden [Wei83]. Autokorrelationsmessungen gaußförmiger Pulse ergeben die korrekte Intensitätskorrelationsfunktion, solange die Pulse ungechirpt oder linear gechirpt sind [Wei83]. Mißt man allerdings die Kreuzkorrelation zweier entgegengesetzt gechirpter Pulse in einem $100\mu\text{m}$ dicken BBO-Kristall kann der spektrale Filtereffekt zu drastischen Meßfehlern führen, wie im Folgenden gezeigt wird. Dieses Problem kann gelöst werden, indem man zur Korrelationsmessung andere nichtlineare optische Prozesse verwendet, wie zum Beispiel die durch zwei Photonen induzierte Erzeugung freier Ladungsträger in Halbleitern [Ran97, Feu97]. Im sichtbaren Spektralbereich (zwischen 420 nm und 760 nm) bietet sich die Verwendung von SiC Photodioden an (SiC hat eine Bandlücke von ca. 3.1 eV (entspricht ca. 400 nm)) [Feu97]. Abbildung 4.6 zeigt den Meßaufbau, mit dem sowohl die Autokorrelationsmessungen als auch die Kreuzkorrelationsmessungen und die Messungen an den biologischen Proben durchgeführt wurden. Die Spiegel M1 und M2 befinden sich auf Repositionierplatten und können problemlos hinzugefügt oder entfernt werden, je nachdem ob eine Autokorrelation der Anregung (NOPAI), des Abtastimpulses (NOPAII) oder eine Kreuzkorrelation zwischen den beiden Pulsen gemessen werden soll. Am Probenort kann die Probe für Korrelationsmessungen

gegen einen Kristall ($100\mu\text{m}$ -BBO oder $25\mu\text{m}$ -BBO) oder gegen eine SiC-Diode ausgetauscht werden. Die NOPAs I und II wurden für die Kreuzkorrelationsmessungen auf Wellenlängen von 500 nm und 600 nm justiert. Die Spektren der so erzeugten Pulse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Jeder Puls wurde anschließend in einem Prismenkompressor komprimiert. Für bestmögliche Pulskompression (kein Chirp) konnte die Halbwertsbreite der Autokorrelation des grünen Pulses (500 nm) mittels der SiC-Diode zu 15.1 fs , und in einem $100\mu\text{m}$ -BBO zu 14.7 fs bestimmt werden (Abbildung 4.8). Analog erhält man für den ungechirpten roten Puls (600 nm) 17 fs

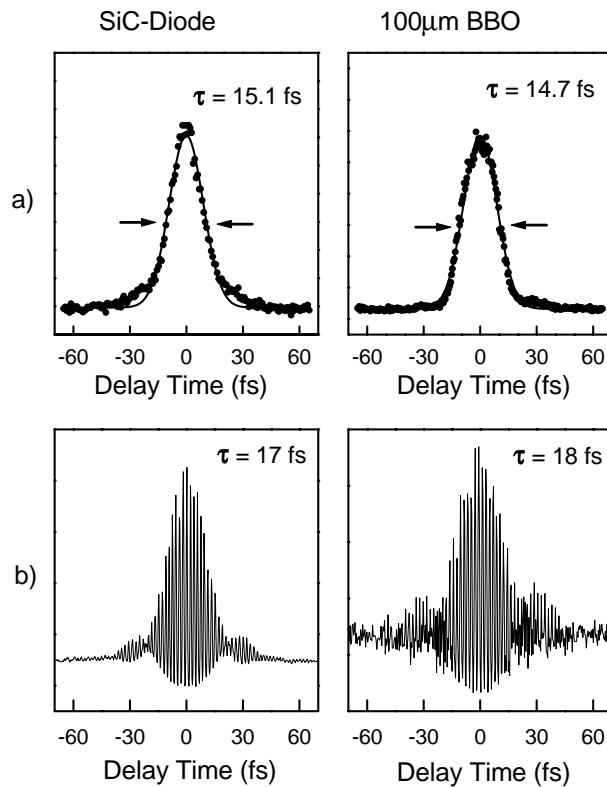


Abbildung 4.8: Autokorrelationsmessung a) der grünen Pulse (500 nm) (Intensitätsautokorrelation) und b) der roten Pulse (600 nm) (interferometrische Autokorrelation) gemessen mit links einer SiC-Diode und rechts in einem $100\mu\text{m}$ -BBO.

bei einer Messung mit der SiC-Diode und 18 fs bei Messungen in einem $100\mu\text{m}$ -BBO. Diese Messungen bestätigen die Ergebnisse anderer Gruppen [Ran97, Feu97], die gezeigt haben, daß Autokorrelationsmessungen von kurzen Pulsen durch nicht-lineare optische Prozesse in Halbleitern zu den gleichen Ergebnissen führen, wie die

bisher übliche Methode der Summenfrequenzerzeugung in nichtlinearen Kristallen. Bestimmt man nun die Kreuzkorrelation zwischen den beiden ungechirpten Pulsen, so ergibt sich diese zu 28 fs in der SiC-Diode, zu 29 fs in einem 25 μm -BBO und zu 24 fs in einem 100 μm -BBO. Auch diese Meßergebnisse stimmen noch relativ gut überein. Anders stellt sich die Situation dar, sobald einer der beiden Pulse oder sogar beide Pulse gechirpt sind. Tabelle 4.2 und Abbildung 4.9 zeigen die Meßergebnisse im Vergleich für die SiC-Diode, den 25 μm -BBO und den 100 μm -BBO, wenn man die Kreuzkorrelation zwischen zwei ungechirpten Pulsen, zwischen einem ungechirpten und einem gechirpten Puls und zwischen zwei entgegengesetzt gechirpten Pulsen ermittelt.

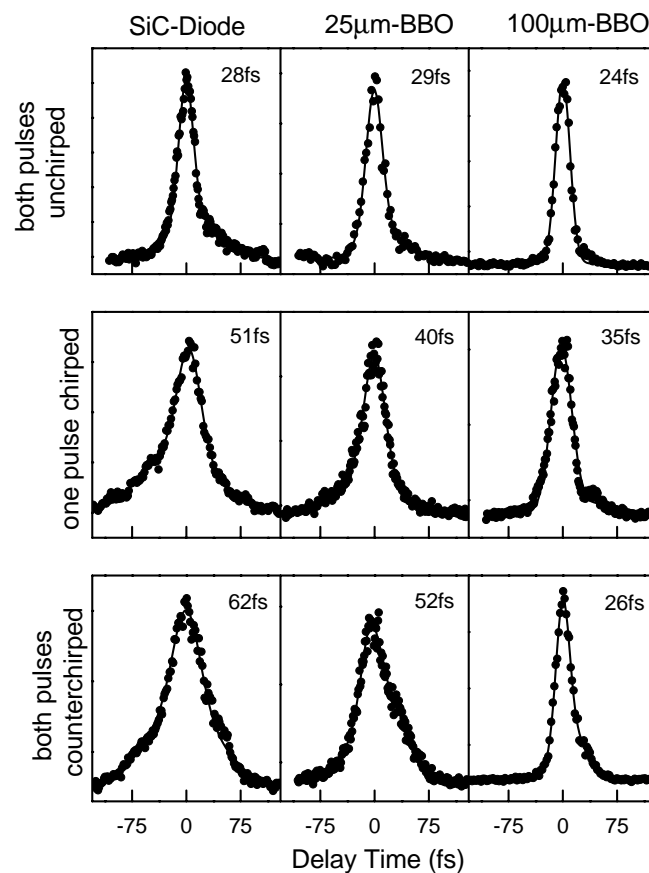


Abbildung 4.9: Vergleich der Kreuzkorrelationsmessungen unterschiedlich gechirpter Pulse mithilfe einer SiC-Diode, eines 25 μm -BBO und eines 100 μm -BBO.

Obwohl im Fall zweier entgegengesetzt gechirpter Pulse beide Pulse lang sind, ergeben Messungen im 100 μm -BBO eine kurze Kreuzkorrelationsbreite. Die Ursache für derartige Fehler bei der Kreuzkorrelationsmessung liegt an der spektralen Filter-

Chirp (fs/THz) des Impulses bei 500 nm	Chirp (fs/THz) des Impulses bei 600 nm	SiC (fs)	25 μ m-BBO (fs)	100 μ m-BBO (fs)
0	0	28	29	24
0	1.867	51	40	35
-2.075	1.867	62	52	26

Tabelle 4.2: Meßwerte für die Kreuzkorrelationen zwischen ungechirpten und gechirpten Pulsen mit einer SiC-Diode, einem 25 μ m-BBO und einem 100 μ m-BBO.

wirkung des 100 μ m-BBO durch mangelnde Phasen Anpassung über den ganzen Wellenlängenbereich des Pulses. Da der Phasen Anpassungswinkel für die Erzeugung der Summenfrequenz so gewählt ist, daß er für die Zentralfrequenzen der erzeugenden Wellen optimal ist, kann bei einem 100 μ m dicken Kristall keine Phasen Anpassung für die Randfrequenzen des breiten Spektrums gewährleistet werden. Ein zeitlicher Überlapp zwischen den roten (blauen) Anteilen der Welle E_1 und den roten (blauen) Anteilen der Welle E_2 erzeugen keine Welle E_3 . So stellt der Kristall einen spektralen Filter für die Erzeugung der Welle E_3 dar, was eine Verkürzung der Kreuzkorrelation zur Folge hat. Dies wird verdeutlicht, wenn man das Summenfrequenzsignal (E_3) frequenz aufgelöst gegenüber der Verzögerungszeit t_D aufträgt (Abbildung 4.10).

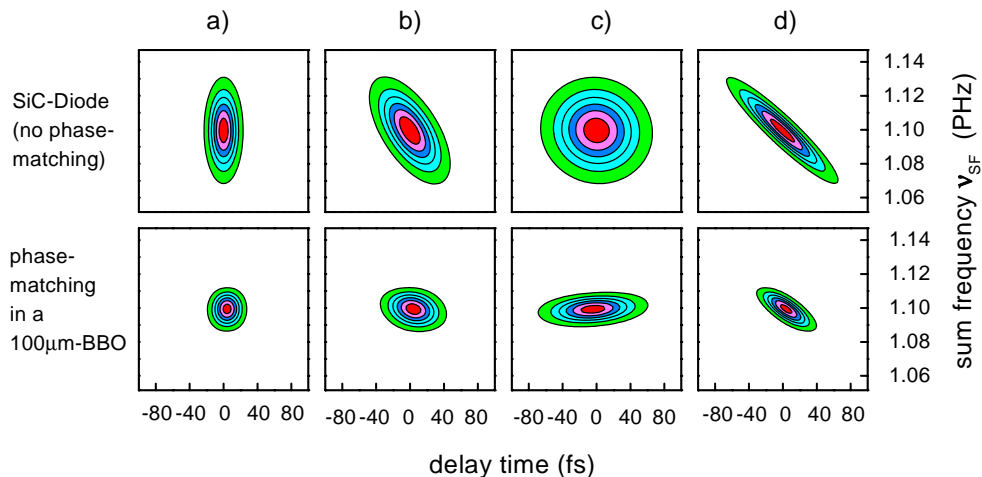


Abbildung 4.10: Frequenz aufgelöstes Summenfrequenzsignal gemäß Rechnungen von Stefan Lochbrunner für a) beide Pulse sind ungechirpt b) der rote Puls (600 nm) ist gechirpt c) beide Pulse sind parallel gechirpt d) beide Pulse sind entgegengesetzt gechirpt.

Bei entgegengesetzt gechirpten Pulsen im $100\mu\text{m}$ -BBO fehlen sowohl die langwelligeren als auch die kurzwelligeren Summenfrequenzanteile: das Signal ist gegenüber dem Signal ohne Phasenanpassung (z.B. SiC-Diode) gestaucht und spiegelt eine kurze Kreuzkorrelationsbreite vor. Die Ergebnisse für Messungen in einem $25\mu\text{m}$ -BBO liegen zwischen den Ergebnissen des $100\mu\text{m}$ -BBO und der SiC-Diode, da bei dünneren Kristallen die Phasenanpassung weniger kritisch ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in Kristallen $\geq 100\mu\text{m}$ Dicke durch spektrales Filtern der Summenfrequenz zu kurze Kreuzkorrelationen gemessen werden können und deshalb Kreuzkorrelationsmessungen mit Hilfe der SiC-Diode zuverlässiger sind [Loc98, Loc00].

Bei den Messungen an Bakteriorhodopsin wurde vor und nach jeder Messung eine Kreuzkorrelation in einem $25\mu\text{m}$ -BBO durchgeführt, um die aktuelle Kreuzkorrelationsbreite und den exakten Zeitnullpunkt zu bestimmen. Der $25\mu\text{m}$ -BBO wurde gewählt, da er im Vergleich zum $100\mu\text{m}$ -BBO einen geringeren Fehler aufweist, und da er leichter gegen die Probenküvette ausgetauscht werden kann als die SiC-Diode.

Kapitel 5

Femtosekundenspektroskopie an Reaktionszentren des Bakteriums *Rhodopseudomonas viridis*

5.1 Probenpräparation

Die hier verwendeten Proben wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hergestellt. Hierbei wurden die Reaktionszentren mit Hilfe von Detergenzien aus der Zellmembran gelöst und von den Antennen befreit. Für die Messungen befinden sich die Reaktionszentren in einem Tris-LDAO Puffer, der den richtigen pH-Wert ($\text{pH} = 7$) und die amphiphile Umgebung, die die Reaktionszentren benötigen, gewährleistet. Bei der Mutante L168HF war die Aminosäure Histidin L168 gegen ein Phenylalanin im L-Ast des Proteingerüsts ausgetauscht. Einzelheiten über die Extraktion der Reaktionszentren aus einem genetisch verändertem Bakterienstamm findet man in [Sch94, Doh95]. Für die Tieftemperaturmessungen wurde zu den Proben ca. 54% v/v Glycerin zugegeben, um bei tiefen Temperaturen ($T < 200 \text{ K}$) eine hohe Transparenz sicherzustellen. Höhere Glycerinkonzentration bewirkt eine Dehydrierung, niedrigere Konzentration führt zu irreversiblen Eintrübungen der Probe [Bie95]. Da die Probe in gefrorenem Zustand nicht mehr umgerührt werden kann, also der Austausch des angeregten Volumens nicht mehr gewährleistet ist, wurde auf etwa 200 μl etwa 0.03 g Benzylviologen (entspricht ca. 0.32 Molar) gegeben. Das Redoxpotential von Benzylviologen (-350 mV) liegt unter dem Redoxpotential der Chinone Q_A (-160 mV) und Q_B (ca. 0 mV) [Sho87a, Sho87b, Wra80], so daß die Chinone zu Q_A^- bzw. zu Q_B^- reduziert werden. Der Elektronentransfer vom Pheophytin zum Chinon ist daher geblockt, und das Elektron rekombiniert in einer Zeit

von ca. 13 ns bei Raumtemperatur zum Grundzustand [Ogr88b]. Bei einer Wiederholrate von 20 Hz kann also davon ausgegangen werden, daß sich die Probe bei jeder Laseranregung wieder im Grundzustand befindet. Kontrollmessungen zeigten, daß im Rahmen der Meßgenauigkeit bei der Bestimmung der ersten beiden Elektronentransferzeiten τ_1 und τ_2 mit und ohne Austausch des Probenvolumens die gleichen Ergebnisse erhalten wurden [Hup96]. Für die Tieftemperaturmessungen wurde die Probe in eine Acrylglasküvette mit 1 mm Schichttiefe gefüllt, und mit Zweikomponentenkleber vakuumdicht verschlossen. Nach Zugabe des Glycerins hatten die verschiedenen Proben eine Absorbance zwischen 0.7 und 1 in der P-Bande bei 960 nm. Gekühlt wurde die Probe in einem kommerziellen Heliumkryostat.

5.2 Stationäre Spektren

Zu einer ersten Charakterisierung der Proben wurden sowohl bei Raumtemperatur, als auch bei tiefen Temperaturen stationäre Spektren aufgenommen (zur Zuordnung der Absorptionsbanden zu den Chromophoren, siehe Kapitel 2). Die Spektren wurden in einem kommerziellen Spektrometer der Firma Perkin Elmer in Quarz- oder Acrylglasküvetten mit 1 mm Schichttiefe aufgenommen. Abbildung 5.1 zeigt die Temperaturabhängigkeit der stationären Spektren für den Wildtyp. Die Verbreiterung der Absorptionsbanden bei höheren Temperaturen, sowie die Erniedrigung einiger Absorptionsmaxima werden durch stärkere Schwingungsbewegung verursacht. Deshalb kann man bei tiefen Temperaturen Banden auflösen, die bei Raumtemperatur durch die Verbreiterung nicht erkennbar waren, z.B. kann man im Bereich der $Q_Y(B)$ -Bande bei Temperaturen kleiner als 240 K die $Q_Y(B_A)$ -Bande, die $Q_Y(B_B)$ -Bande, die $Q_Y(H_A)$ -Bande und die $Q_Y(H_B)$ -Bande auflösen. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima der gleichen Chromophore werden verursacht durch die unterschiedliche Kopplung zu verschiedenen Aminosäuren des Proteingerüsts des aktiven und des inaktiven Astes. Außerdem kann man in der langwelligen Flanke der $Q_Y(B)$ -Bande die obere excitonische Bande der $Q_Y(P)$ -Bande erkennen. Die Aufspaltung der $Q_Y(P)$ -Bande ist durch die excitonische Kopplung der beiden Bacteriochlorophylle im Dimer zu erklären. Während die meisten Banden durch die Änderung der Temperatur ihre spektrale Lage nicht verändern, schiebt die $Q_Y(P)$ -Bande bei Abkühlung der Probe von 960 nm bei Raumtemperatur zu 1000 nm bei 30 K. Diese Rotverschiebung ist auf eine verstärkte exzitonische Kopplung innerhalb des Dimers bei tiefen Temperaturen und der daraus folgenden energetischen Absenkung des angeregten Zustandes der unteren Dimerbande zurückzuführen. Die aus den

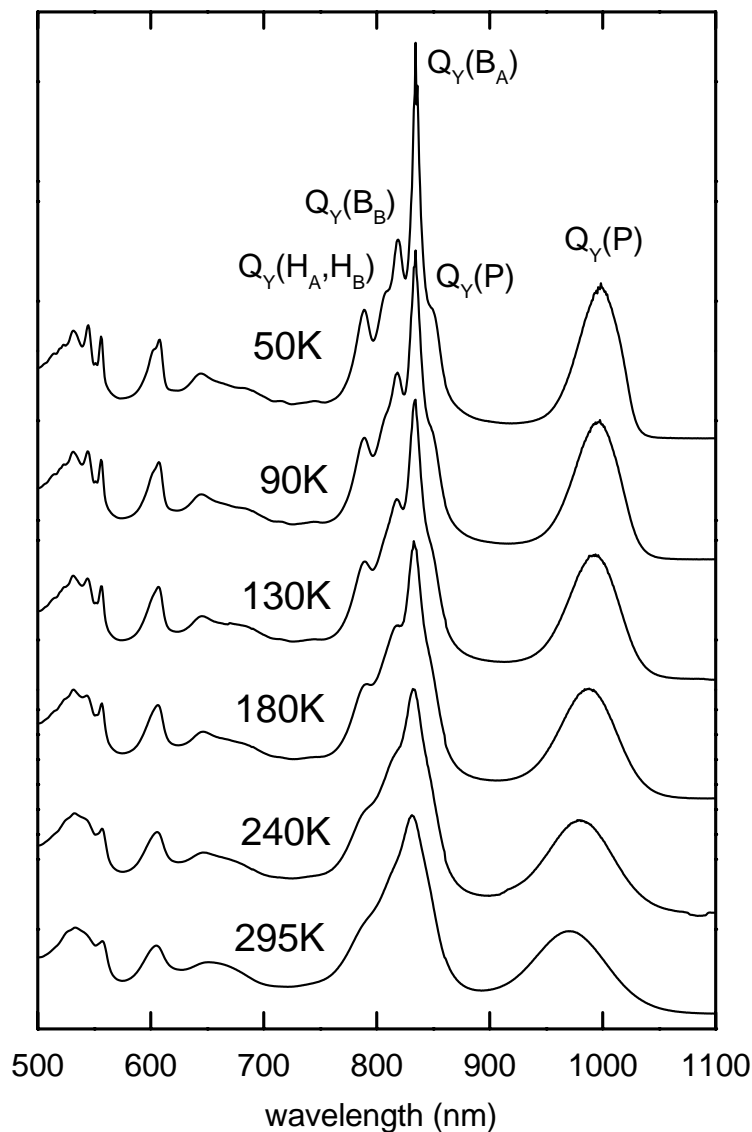


Abbildung 5.1: Temperaturabhängige Absorptionsspektren des Wildtypreaktionszentrums von *Rps. viridis*.

Meßdaten errechnete Verschiebung der $Q_Y(P)$ -Bande liegt im Bereich von knapp 400 cm^{-1} und ist etwa proportional zur Temperaturänderung. Ähnliches Verhalten wurde bei temperaturabhängigen Spektren von *Rb. sphaeroides* beobachtet. Dort konnte aus der Verschiebung der $Q_Y(P)$ -Bande die energetische Absenkung des angeregten Zustandes zu ca. 300 cm^{-1} berechnet werden [Hub97]. Abbildung 5.2 zeigt die Temperaturabhängigkeit der stationären Spektren für die Mutante L168HF. Die Effekte im Bereich der $Q_Y(B)$ -Bande sind erwartungsgemäß ähnlich wie bei den

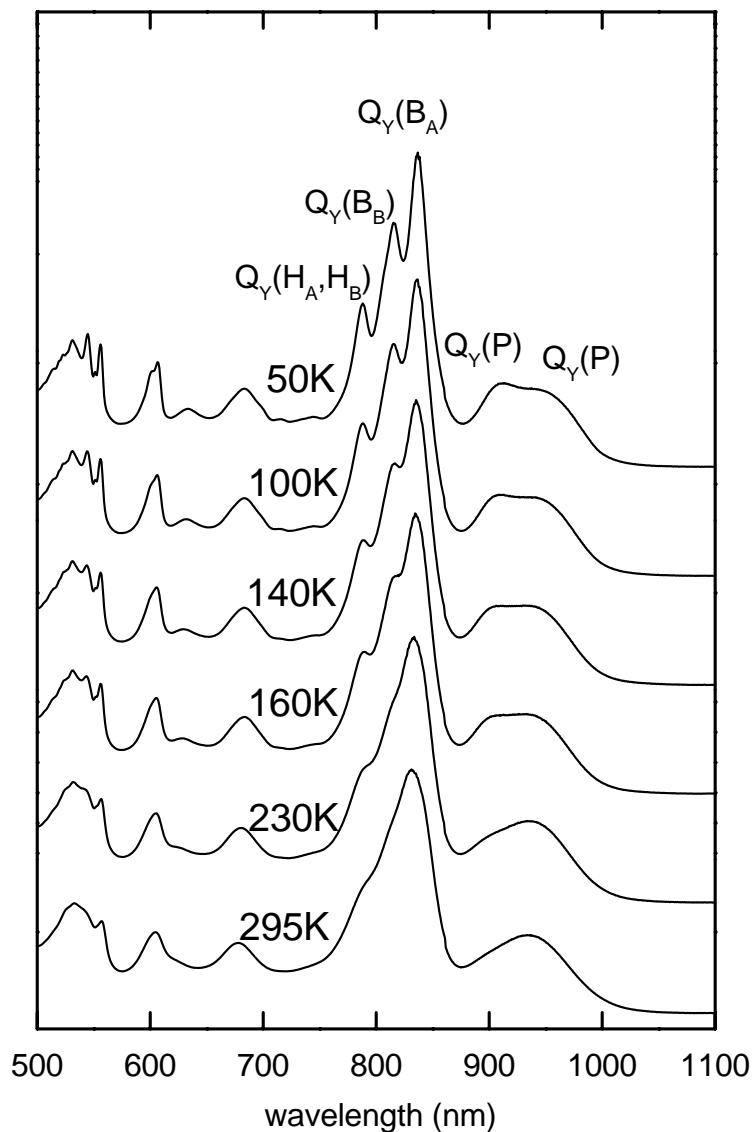


Abbildung 5.2: Temperaturabhängige Absorptionsspektren des Reaktionszentrums der Mutante L168HF von *Rps. viridis*.

Wildtypspektren, da durch die Entfernung einer Wasserstoffbrückenbindung zum Special Pair nur der Bereich der P-Bande geändert wurde. In erster Linie verschiebt sich durch die Mutation das Maximum der $Q_Y(P)$ -Bande von 960 nm beim Wildtyp auf 940 nm bei der Mutante L168HF. Noch deutlicher wird der Unterschied bei tiefen Temperaturen: während bei Raumtemperatur das Maximum der $Q_Y(P)$ -Bande der Mutante nur breiter wirkte als das des Wildtypes, kann man bei tiefen Temperaturen erkennen, daß die $Q_Y(P)$ -Bande in zwei Banden aufspaltet. Das langwelligere Ma-

ximum der $Q_Y(P)$ -Bande verhält sich bei Abkühlung der Reaktionszentren ähnlich wie das Maximum der $Q_Y(P)$ -Bande der Wildtypreaktionszentren: es schiebt beim Abkühlen proportional zur Temperaturänderung um knapp 300 cm^{-1} ins Rote. Das kurzwellige Maximum läßt sich erst ab Temperaturen $< 160 \text{ K}$ auflösen. Auch dieses kurzwelligere Maximum schiebt bei Abkühlung der Probe ins Rote, allerdings nicht so stetig wie das langwellige Maximum. Der Betrag der Rotverschiebung zwischen 160 K und 30 K beträgt ca. 100 cm^{-1} .

Die geringere Aufspaltung der $Q_Y(P)$ -Bande bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp läßt auf eine kleinere excitonische Kopplung der beiden Bacteriochlorophylle des Special Pairs schließen. Die Aufspaltung der unteren excitonischen $Q_Y(P)$ -Bande bei tiefen Temperaturen kann alternativ auch folgende Ursache haben: durch das Entfernen der Wasserstoffbrückenbindung vom Proteingerüst zum Special Pair kann sich das Special Pair in zwei verschiedenen Konformationen befinden. Den unterschiedlichen Hauptkonformationen entsprechen dann leicht verschobene Absorptionsmaxima, die erst bei tiefen Temperaturen unterschieden werden können. Die obere Excitonbande liegt bei allen Temperaturen in der $Q_Y(B)$ -Bande versteckt, was durch die im Vergleich zum Wildtyp breitere $Q_Y(B)$ -Bande auch plausibel scheinen könnte. Für die zeitaufgelösten Messungen wurde die Probe immer im langwelligen Teil der $Q_Y(P)$ -Bande bei 970 nm angeregt. Weitere Messungen, die eventuell Aufschluss über eine Anregungswellenlängenabhängigkeit geben, sind für die Zukunft geplant.

5.3 Zeitaufgelöste Messungen am Wildtyp von *Rps. viridis*

Zur Bestimmung der Elektrontransferzeit vom Special Pair P zum Bacteriochlorophyllmonomer B_A und zur Beobachtung der oszillatorischen Anteile in der Dynamik wurden temperaturabhängige Messungen am Maximum der stimulierten Emission von P^* bei 1040 nm durchgeführt. Zusätzlich wurde die Abtastwellenlänge bei Raumtemperatur und bei 70 K zwischen 1020 nm und 1100 nm variiert, um die Abhängigkeit der Wellenpaketsbewegung von der Abtastposition genauer zu untersuchen. Die Temperaturabhängigkeit der zweiten Elektrontransferzeit von B_A zu H_A wurde in der kurzwelligen Flanke der Absorptionsbande $Q_Y(B)$ bei ca. 820 nm gemessen.

5.3.1 Messungen im Bereich der stimulierten Emission von P*

Abbildung 5.3 zeigt eine Meßkurve des Wildtyps von *Rps. viridis* bei 1040 nm. Die Absorptionsabnahme am Zeitnullpunkt wird durch die stimulierte Emission aus dem ersten angeregten Zustand P* verursacht, die bei dieser Wellenlänge im Wildtyp ihr Maximum hat. Der darauffolgende Rückgang des Meßsignals ist proportional zur Besetzungsabnahme des P*-Zustandes. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß

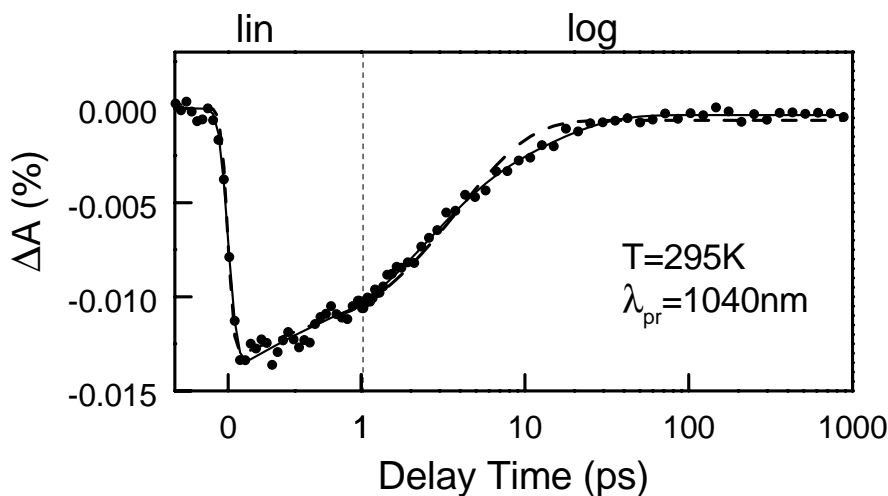


Abbildung 5.3: Beispielhafte Meßkurve für eine Messung im Bereich der stimulierten Emission von P* bei einer Abtastwellenlänge von 1040 nm. Die Anpassung der Meßpunkte (durchgezogene Linie) erfolgte mit den zwei Zeitkonstanten $\tau_{1a} = 2.2$ ps und $\tau_{1b} = 12$ ps. Im Vergleich dazu sieht man die bestmögliche monoexponentielle Datenanpassung mit einer Zeitkonstante $\tau_1 = 4$ ps (gestrichelte Kurve). Bis zu 1 ps erfolgt die Auftragung der Meßpunkte und der Modellkurve linear, im weiteren Verlauf logarithmisch.

der P*-Zerfall nicht exakt einem monoexponentiellen Gesetz folgt, wohingegen eine biexponentielle Datenanpassung den Zerfall des ersten angeregten Zustandes besser widerspiegelt. Eine eindeutige theoretische Begründung für die Nichtmonoexponentialität des P*-Zerfalls existiert noch nicht, jedoch läßt sich qualitativ zeigen, daß eine Verteilung der energetischen Lage des Zustandes $P^+B_A^-$ eine solche Heterogenität erklären kann (siehe Abbildung 5.4) [Har97]. Außerdem wurden in den letzten Jahren bei Messungen an *Rhodobacter sphaeroides* durch die Verbesserung der Zeitaufösung Modulationen des Meßsignals beobachtet [Spö98, Str97, Vos98, Vos96, Vos94, Vos93, Vos91]. Diese Oszillationen werden mit einer Wellenpaketsbewegung

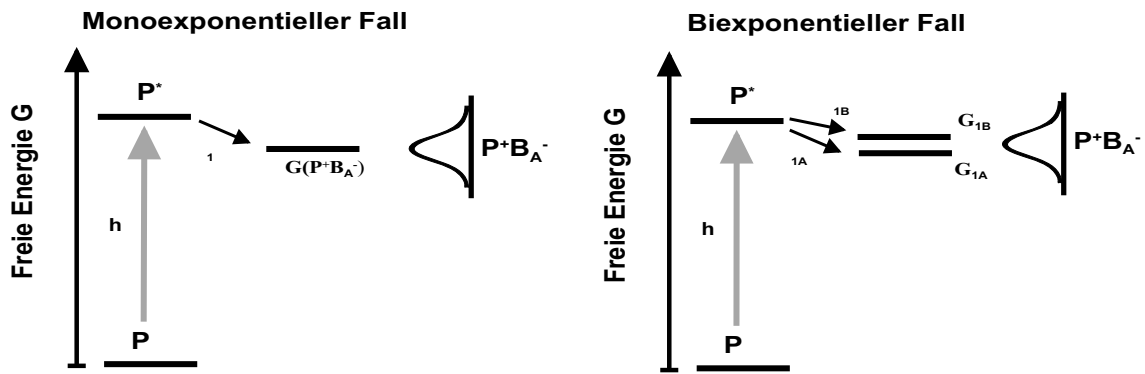


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung einer möglichen Verteilung des Zustandes P^+B^- und deren Beschreibung durch zwei effektive Niveaus, die einer biexponentiellen Datenanpassung entsprechen.

innerhalb der Potentialparabel des ersten angeregten Zustands P^* in Verbindung gebracht. Solche kohärenten Effekte sind weder in einem mono- noch in einem biexponentiellen Gesetz enthalten. Die im Folgenden gezeigten Daten wurden stets biexponentiell, mit zwei Zeitkonstanten τ_{1a} für die schnellere Komponente und τ_{1b} für die langsamere Komponente, angepaßt. Um die Frequenz der Oszillationen zu bestimmen, wurden Meßkurve und Fit voneinander abgezogen, und die so entstandenen Residuen fouriertransformiert. Zur Bestimmung von Amplitude und Dämpfung der Oszillationen wurde die Gleichung 4.9 verwendet, allerdings konnte aufgrund der hohen Anzahl an freien Parametern mit dieser Gleichung nur dann eine gute Anpassung erzielt werden, wenn vorher schon die Zerfallszeiten und die Frequenz der Oszillationen bestimmt wurden.

5.3.1.1 Temperaturabhängigkeit

In Abbildung 5.5 sind die transienten Absorptionsmessungen bei verschiedenen Temperaturen dargestellt, Tabelle 5.1 zeigt die dazugehörigen biexponentiellen Zerfallszeiten sowie das Amplitudenverhältnis $A(\tau_{1a})/A(\tau_{1b})$ zu den beiden Zeitkonstanten. Während die schnelle Komponente τ_{1a} ausgehend von 2.2 ps bei Raumtemperatur bis zu 1.1 ps bei 30 K kürzer wird, zeigt die langsame Komponente τ_{1b} entgegengesetztes Verhalten: sie wird ausgehend von 12 ps bei Raumtemperatur immer langsamer bis sie schließlich 37 ps bei 30 K erreicht. Diese Messungen stimmen qualitativ mit früheren Messungen und Messungen anderer Gruppen überein [Hup96, Bre88, Fle88].

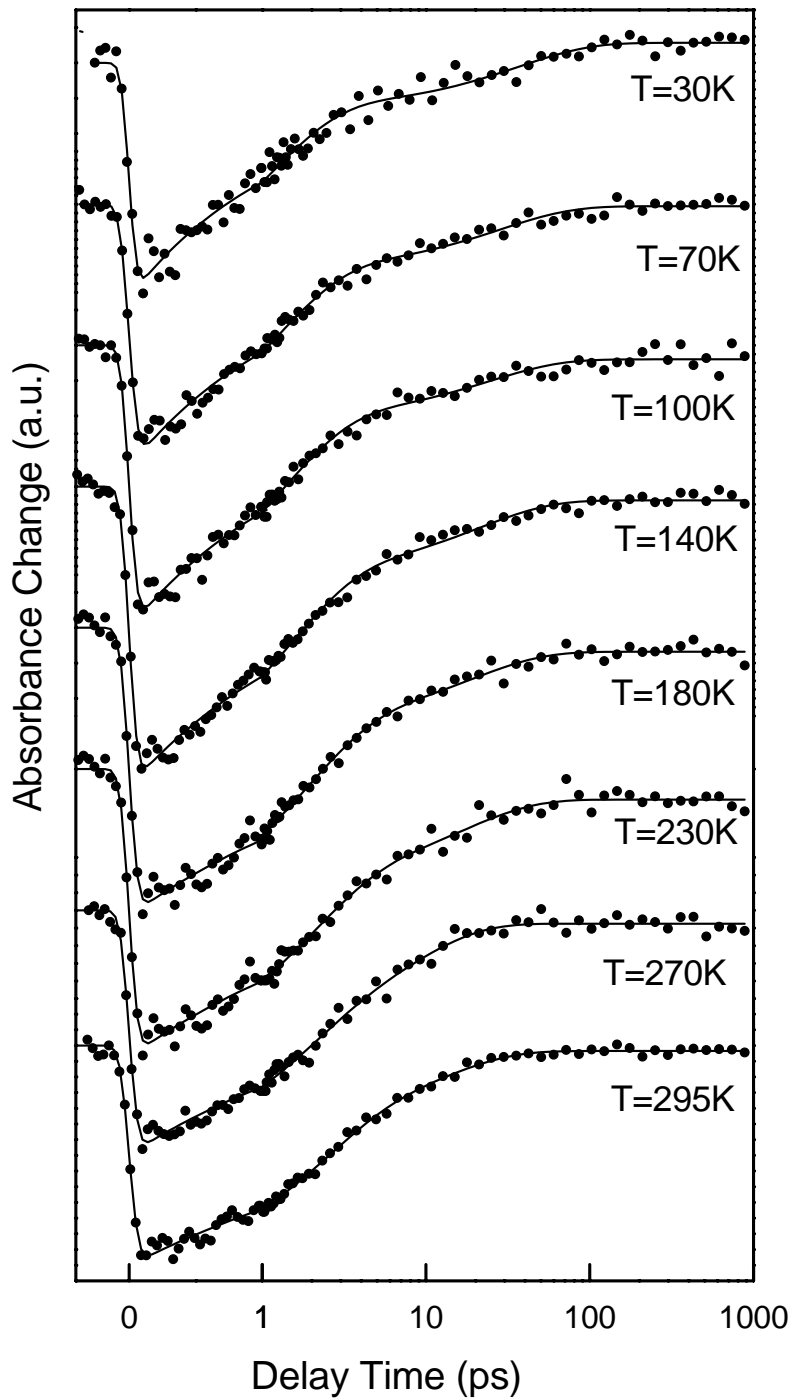


Abbildung 5.5: Temperaturabhängige Messungen des Wildtyps im Bereich der stimulierten Emission von P^* bei 1040 nm. Die Datenanpassung erfolgte mit den Zeiten aus Tabelle 5.1.

Da die langsame biexponentielle Komponente schwach ist, weist das Amplitu-

denverhältnis große Schwankungen auf. Tendenziell wächst bei tiefen Temperaturen die Amplitude der schnellen Zeitkonstante gegenüber der Amplitude der langsamen Zeitkonstante an.

Temperatur (K)	τ_{1a} (ps)	τ_{1b} (ps)	$A(\tau_{1a})/A(\tau_{1b})$
30	1.1	37	2.9
70	1.2	28	3.1
100	1.3	24	3.5
140	1.4	21	2.8
180	1.8	19	2.7
230	1.9	17	2.1
270	2.1	14	1.1
295	2.2	12	1.9

Tabelle 5.1: Biexponentiell angepaßte Zeitkonstanten und Amplitudenverhältnis bei temperaturabhängigen Messungen im Bereich der stimulierten Emission beim Wildtyp.

5.3.1.2 Wellenlängenabhängigkeit

Bei den Messungen mit verschiedenen Abtastwellenlängen wurde besonderer Wert auf eine gute Zeitauflösung gelegt, um die Modulationen, die dem Meßsignal überlagert sind, gut auflösen zu können. Abbildung 5.6 links zeigt die Raumtemperaturmeßkurven bei Variation der Abtastwellenlänge in einem Wellenlängenbereich zwischen 1020 nm und 1100 nm. Auffallend an den Meßkurven ist die Absorptionzunahme für lange Verzögerungszeiten bei langwelliger Abtastwellenlänge. Dies liegt daran, daß die P⁺-Bande im Wildtyp bei 1300 nm ein Absorptionsmaximum besitzt [Bre85, Rei95]. Ausläufer dieser Bande konnten schon in früheren Messungen bei einer Abtastwellenlänge von 1050 nm beobachtet werden [Dre91a]. Bei den hier gezeigten Raumtemperaturmessungen tritt der Absorptionssockel ab 1060 nm auf. Die Anpassung der Meßdaten erfolgte für alle Kurven mit den zwei Zerfallszeiten $\tau_{1a} = 2.2$ ps und $\tau_{1b} = 12$ ps, die aus der Raumtemperaturmessung der temperaturabhängigen Messungen bekannt sind. Je langwelliger die Abtastwellenlänge ist, desto größer wird die Amplitude der schnellen Komponente τ_{1a} gegenüber der Amplitude der langsamen Komponente τ_{1b} (siehe Tabelle 5.2). (Allerdings läßt sich keine Verbesserung der Datenanpassung erzielen, wenn man eine weitere Zerfallszeit τ_2 berücksichtigt.)

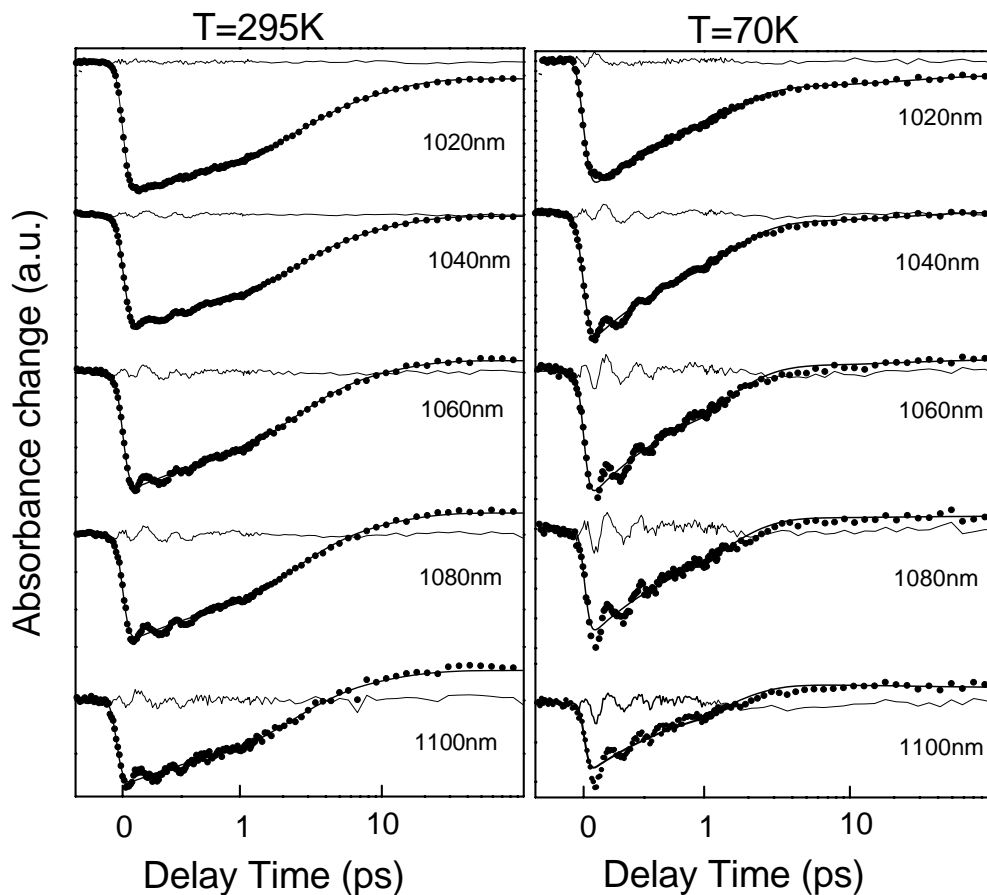


Abbildung 5.6: Wellenlängenabhängige Messungen des Wildtyps bei Raumtemperatur (links) und bei 70 K (rechts), die Anpassung der Meßpunkte erfolgte über den ganzen Wellenlängenbereich mit den Zeitkonstanten $\tau_{1a} = 2.2$ ps und $\tau_{1b} = 12$ ps bei Raumtemperatur, und $\tau_{1a} = 1.2$ ps und $\tau_{1b} = 28$ ps bei $T = 70$ K.

λ_{pr} (nm)	$A(\tau_{1a})/A(\tau_{1b})$ (RT)	$A(\tau_{1a})/A(\tau_{1b})$ (70 K)
1020	2.5	9.1
1040	3.2	11.5
1060	3.7	20.4
1080	3.8	64.6
1100	4.5	-

Tabelle 5.2: Amplitudenverhältnis bei biexponentieller Datenanpassung mit den Zeitkonstanten $\tau_{1a} = 2$ ps und $\tau_{1b} = 9$ ps bei Raumtemperatur und $\tau_{1a} = 1.2$ ps und $\tau_{1b} = 28$ ps bei $T = 70$ K bei wellenlängenabhängigen Messungen im Bereich der stimulierten Emission zwischen $\lambda_{pr} = 1020$ nm und 1100 nm.

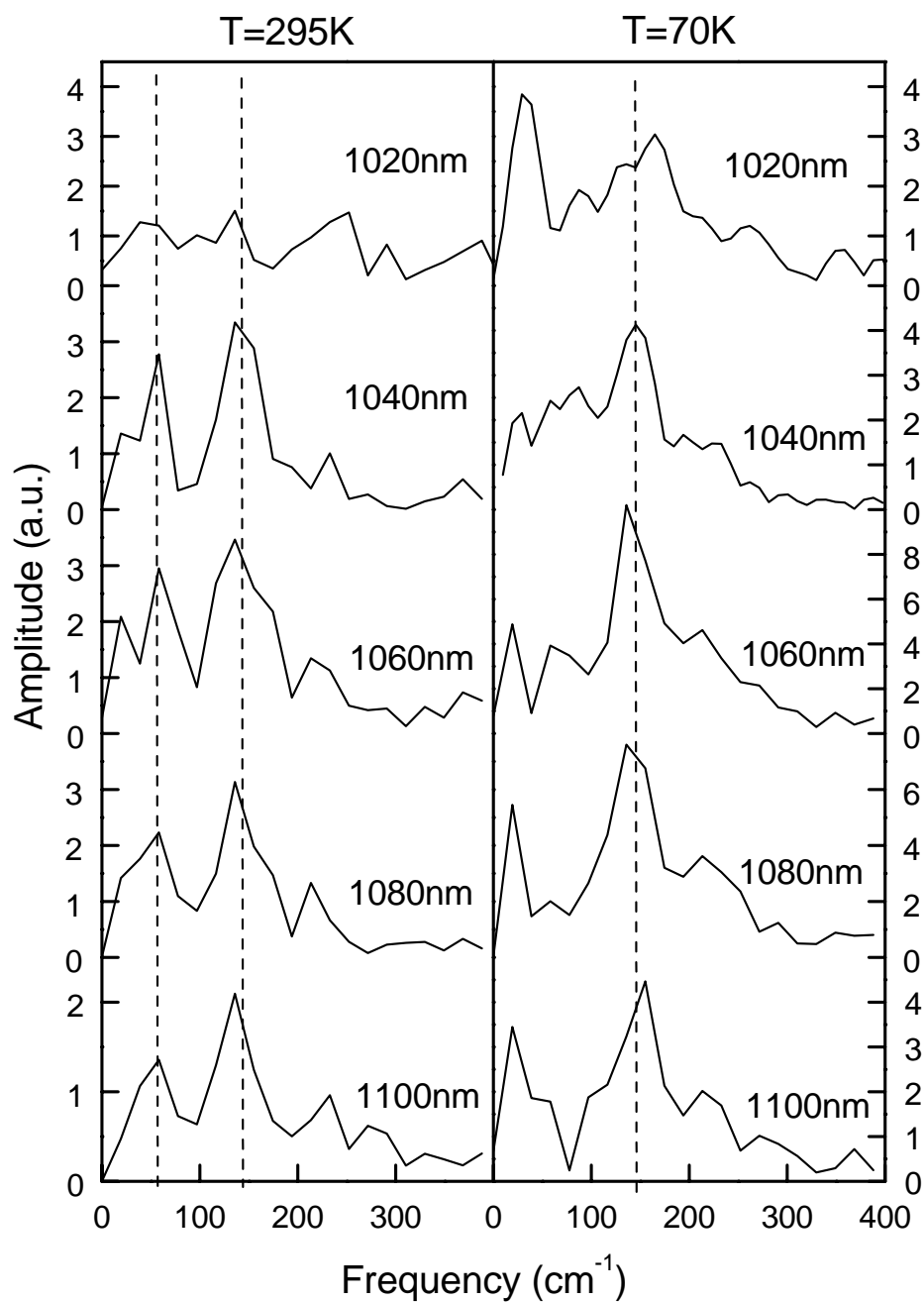


Abbildung 5.7: Fouriertransformation der Residuen für die wellenlängenabhängigen Meßkurven bei Raumtemperatur (links) und bei $T = 70\text{ K}$ (rechts). Die gestrichelten Linien zeigen die über den ganzen Wellenlängenbereich konstanten Maxima bei 56 cm^{-1} und bei 145 cm^{-1} .

Subtrahiert man die so erhaltenen Modellkurven von den Meßdaten, so erhält

man die Residuen. Abbildung 5.7 zeigt die Fouriertransformation der Residuen. Während bei einer Abtastwellenlänge von 1020 nm keine Oszillationen auftreten, bzw. mögliche Oszillationen mit der vorhandenen Zeitaufösung nicht aufgelöst werden konnten, und auch im Fourierspektrum keine Banden zu sehen sind, zeigen die Fouriertransformierten der Meßkurven bei Wellenlängen zwischen 1040 nm und 1100 nm zwei deutliche Banden bei ca. 56 cm^{-1} und bei ca. 145 cm^{-1} , und eine schwache Bande bei ca. 230 cm^{-1} . Diese drei Frequenzen bleiben über den hier beobachteten Wellenlängenbereich konstant.

Ähnliche Ergebnisse erhält man bei der Betrachtung der Tieftemperaturmeßkurven (siehe Abbildung 5.6). Auch bei 70 K zeigt sich bei längeren Wellenlängen eine Absorptionzunahme, die der P^+ -Bande zuzuordnen ist. Allerdings ist der Effekt hier schwächer als bei Raumtemperatur, was darauf zurückzuführen sein könnte, daß der Absorptionssockel zwischen 1000 nm und 1200 nm [Rei95] bei tieferen Temperaturen seine Form ändert. Die Meßdaten Anpassung erfolgte auch hier mit den beiden Zeitkonstanten $\tau_{1a} = 1.2\text{ ps}$ und $\tau_{1b} = 28\text{ ps}$, die schon bei den temperaturabhängigen Messungen bestimmt wurden. Auch bei 70 K konnten die Meßdaten mit diesen beiden Zeitkonstanten gut angepaßt werden, und die Hinzunahme einer weiteren Zerfallszeit erwies sich als überflüssig. Betrachtet man das Amplitudenverhältnis (Tabelle 5.2) erkennt man auch bei 70 K eine Zunahme der schnelleren Komponente bei längeren Wellenlängen. Die Fouriertransformierten der Residuen (Abbildung 5.7) zeigen ein deutliches Maximum bei 145 cm^{-1} ; das zweite Maximum bei ca. 56 cm^{-1} , das bei den Raumtemperaturmessungen zu sehen war, ist nicht eindeutig zu identifizieren. Die schwache Bande bei ca. 230 cm^{-1} ist auch bei 70 K als höherfrequenter Ausläufer der 145 cm^{-1} -Bande zu erkennen.

5.3.2 Messungen der Temperaturabhängigkeit im Bereich der B-Bande

Die Bestimmung der Elektronentransferzeit τ_2 vom Bacteriochlorophyllmonomer B_A zum Pheophytin H_A erwies sich im Wildtyp als sehr schwierig, da die maximale Besetzung dieses Zustandes nur 13 % beträgt. Dies wird dadurch verursacht, daß der Zustand $P^+B_A^-$ im Wildtyp wesentlich schneller entleert als bevölkert wird. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß die Absorptionsbande $Q_Y(B)$ bei Bildung von $P^+H_A^-$ und $P^+Q_A^-$ ca. 20 nm ins Blaue verschoben wird [Han87]. Diese Blauverschiebung ist verknüpft mit der Zeitkonstanten τ_1 und führt zu größeren Absorptionsänderungen als das Ausbleichen der monomeren Bacteriochlorophyll-Bande bei

der Bildung von $P^+B_A^-$ (da die Besetzung dieses Zustandes so klein ist (s.o.)).

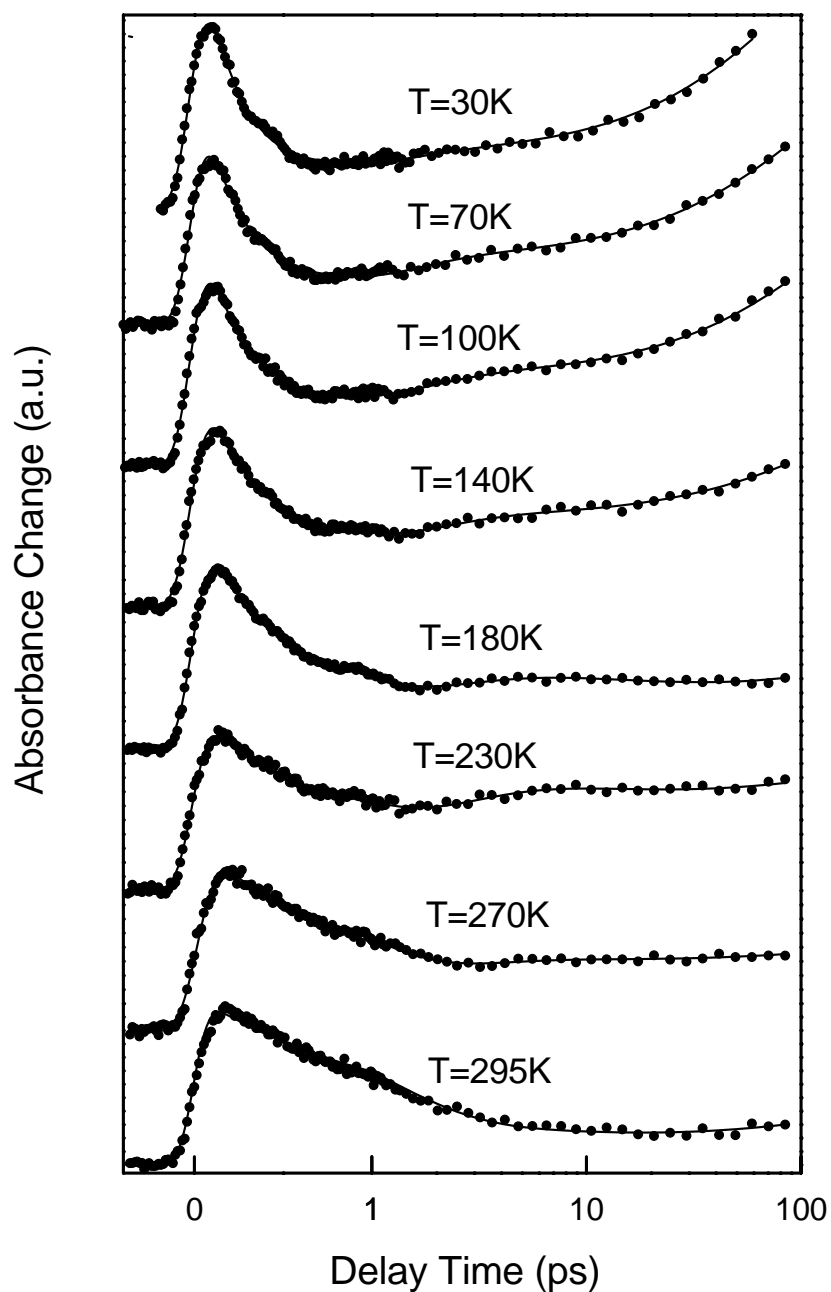


Abbildung 5.8: Temperaturabhängige Messungen am isosbestischen Punkt der B-Bande. Die Anpassung erfolgte mit den Zeiten τ_{1a} und τ_{1b} , die im Bereich der stimulierten Emission bestimmt wurden, und mit den Zeiten τ_2 und τ_3 (siehe Tabelle 5.3).

Temperatur (K)	τ_{1a} (ps)	τ_{1b} (ps)	τ_2	τ_3
30	1.1	37	0.21	110
70	1.2	28	0.26	120
100	1.3	24	0.26	130
140	1.4	21	0.33	160
180	1.8	19	0.47	300
230	1.9	17	0.6	120
270	2.1	14	0.75	400
295	2.2	12	1.05	250

Tabelle 5.3: Zeitkonstanten für die Anpassung im Bereich der B-Bande: τ_{1a} und τ_{1b} wurden in den Messungen der stimulierten Emission bei $\lambda_{pr} = 1040$ nm ermittelt, τ_2 ist die Transferzeit von $P^+B_A^-$ zu $P^+H_A^-$.

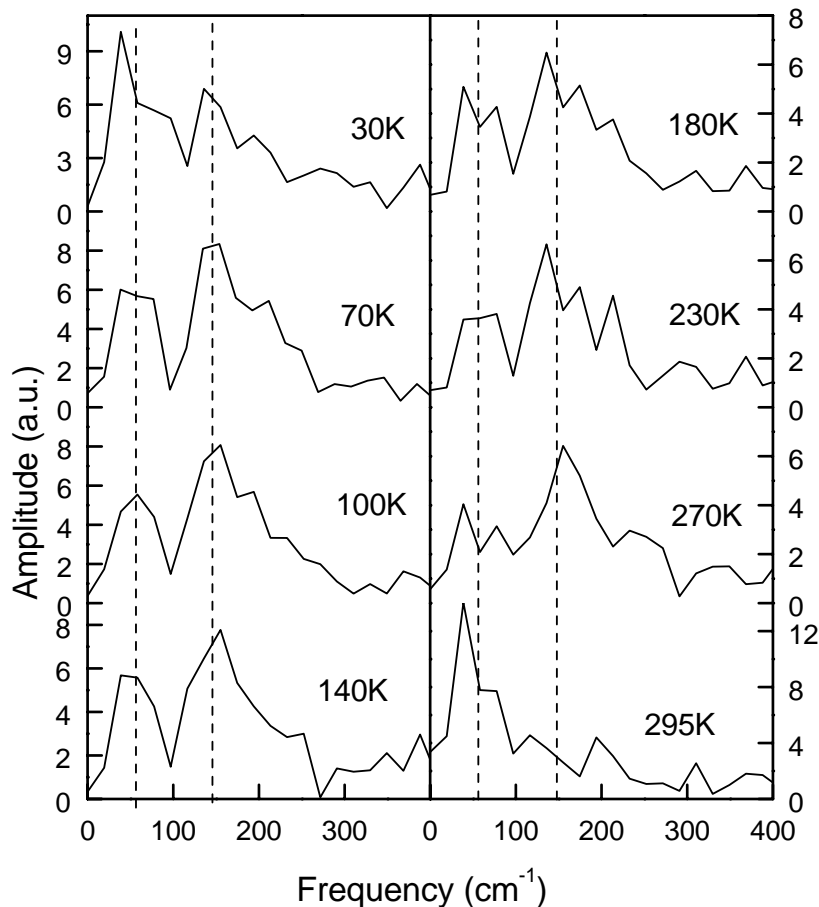


Abbildung 5.9: Fouriertransformation der Residuen für die temperaturabhängigen Meßkurven im Bereich der B-Bande. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Frequenzmaxima, die bei den Messungen im Bereich der stimulierten Emission gefunden wurden.

Es existiert allerdings ein Spektralbereich bei ca. 820 nm (isosbestischer Punkt), an dem sich die Absorption beim Übergang $P^* \rightarrow P^+B_A^-$ nicht ändert und die Amplitude der Zeit τ_1 fast völlig verschwindet. In diesem Bereich kann das Ausbleichen der Bacteriochlorophyllmonomerbande beobachtet, und somit die Zeit τ_2 genau bestimmt werden. Der isosbestische Punkt liegt beim Wildtyp bei Raumtemperatur bei 821 nm [Pen95] und verändert seine spektrale Position beim Abkühlen der Probe nicht wesentlich. Abbildung 5.8 zeigt die temperaturabhängigen Messungen im Bereich der $Q_Y(B)$ -Bande bei einer Abtastwellenlänge von 822 nm. Die Datenanpassung der Meßkurven erfolgte mit vier Zeitkonstanten: τ_{1a} und τ_{1b} wurden aus den Messungen im Bereich der stimulierten Emission übernommen, da sie in diesem Bereich am genauesten bestimmt werden können, τ_2 und τ_3 wurden als freie Parameter angepasst. Die Zeit τ_3 bestimmt die Transferzeit vom Pheophytin H_A zum Chinon Q_A . Da das Chinon Q_A durch die Zugabe von Benzylviologen (siehe Kapitel 5.1) reduziert sein sollte, ist die Zeit τ_3 vermutlich eine Mischung aus Transfer zu einigen nichtreduzierten Quinonen und Rekombination in den Grundzustand und somit für den primären Elektronentransfer bedeutungslos.

Tabelle 5.3 zeigt den vollständigen Datensatz, der für die Anpassung der Kurven im Bereich der B-Bande benötigt wurde. Wie man sieht, beschleunigt auch die zweite Elektrontransferzeit τ_2 beim Abkühlen von 1.05 ps bei Raumtemperatur bis zu 0.2 ps bei 30 K. Der Raumtemperaturwert liegt etwas über dem aus der Literatur bekannten Wert ($\tau_2 = 0.65$ ps), was durch die Reduktion des Chinons und die damit geänderte Energetik des Zustandes $P^+H_A^-$ in den Benzyl Viologen enthaltenden Proben zu erklären ist. Obwohl in diesem Wellenlängenbereich die Zeitauflösung etwas schlechter war als im Bereich der stimulierten Emission (die Kreuzkorrelationsbreite ergab sich zu ca. 170 fs im Vergleich zu 90 fs bei Abtastwellenlängen zwischen 1020 nm und 1100 nm), sind in den Meßkurven bei tiefen Temperaturen noch Andeutungen von Oszillationen erkennbar.

Subtrahiert man wieder die angepasste Kurve von den Meßdaten und fouriertransformiert man die Residuen so erhält man ähnliche Oszillationsfrequenzen wie im Bereich der stimulierten Emission (siehe Abbildung 5.9).

5.4 Zeitaufgelöste Messungen an der Mutante L168HF

Wie beim Wildtyp wurden auch bei der Mutante L168HF Messungen im Bereich der stimulierten Emission und im Bereich der $Q_Y(B)$ -Bande durchgeführt. Auch für

die Mutante konnten Temperaturabhängigkeit des ersten und zweiten Elektronentransferschrittes, sowie die Wellenlängenabhängigkeit im Bereich der stimulierten Emission untersucht werden.

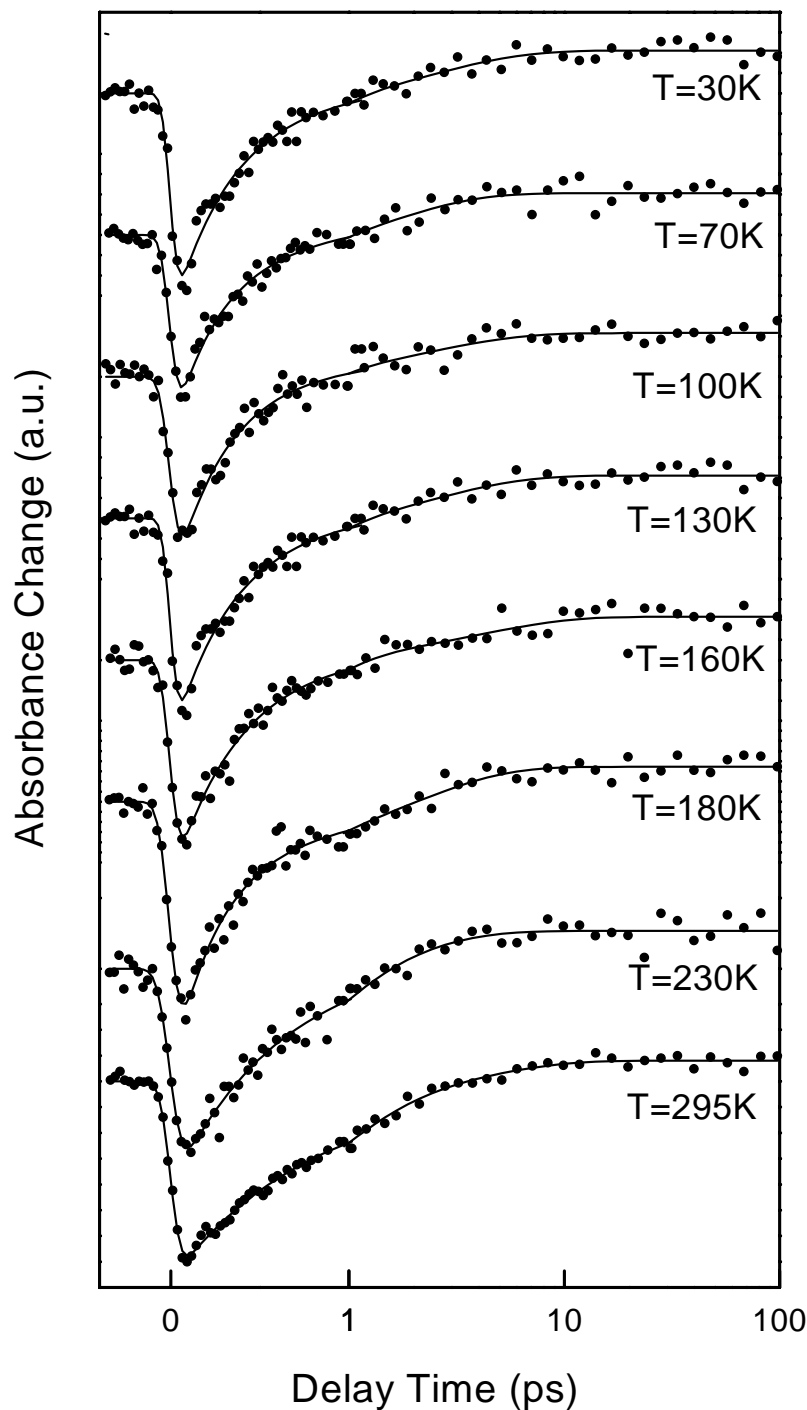


Abbildung 5.10: Temperaturabhängige Messungen der Mutante L168HF im Bereich der stimulierten Emission von P^* bei 1020 nm. Die Datenanpassung erfolgte mit Werten aus Tabelle 5.4.

5.4.1 Messungen im Bereich der stimulierten Emission von P*

Durch die Blauverschiebung der $Q_Y(P)$ -Bande durch die Mutation um ca. 20 nm gegenüber dem Wildtyp (siehe Spektren), ist es anzunehmen, daß sich auch das Maximum der stimulierten Emission um ca. 20 nm ins Kurzwellige verschiebt. Die temperaturabhängigen Messungen wurden deshalb alle bei einer Abtastwellenlänge $\lambda_{pr} = 1020$ nm durchgeführt. Die Wellenlängenabhängigkeit konnte bei der Mutante nur zwischen 1020 nm und 1060 nm untersucht werden, da durch die schwierigere Herstellung der mutierten Reaktionszentren im Vergleich zu den Wildtypreaktionszentren weniger Probenmaterial vorhanden war, die Probe der mutierten Reaktionszentren nicht so hoch konzentriert werden konnte, und das Signal deshalb bei Abtastwellenlängen > 1060 nm zu klein wurde.

Temperatur (K)	τ_{1a} (ps)	τ_{1b} (ps)	$A(\tau_{1a})/A(\tau_{1b})$
30	0.25	1.7	1.9
70	0.25	1.5	2.0
100	0.29	2.4	3.9
130	0.32	2.4	3.1
155	0.36	3.4	4.3
180	0.35	3.0	3.3
230	0.54	1.6	2.3
295	0.72	3.5	3.1

Tabelle 5.4: Durch biexponentielle Datenanpassung erhaltene Zeitkonstanten und Amplitudenverhältnis der temperaturabhängigen Messungen im Bereich der stimulierten Emission bei der Mutante L168HF.

5.4.1.1 Temperaturabhängigkeit

Abbildung 5.10 zeigt die temperaturabhängigen Messungen bei 1020 nm von Reaktionszentren der Mutante L168HF. Schon bei Raumtemperatur findet man bei der Mutante einen deutlich schnelleren primären Elektronentransfer als beim Wildtyp: bei biexponentieller Datenanpassung ergibt sich die schnellere Komponente τ_{1a} zu 0.8 ps im Vergleich zu 2.2 ps beim Wildtyp (siehe Tabelle 5.4). Durch Abkühlung der Probe von Raumtemperatur bis ca. 150 K wird der erste Elektronentransferschritt stark beschleunigt (0.36 ps bei 150 K). Bei weiterem Abkühlen der Probe ändert

sich die Elektrontransferzeit nur geringfügig auf 250 fs. Die langsame Komponente τ_{1b} liegt zwischen 1 ps und 3 ps und weist große Schwankungen auf. Es läßt sich über den beobachteten Temperaturbereich keine eindeutige Aussage über den Verlauf der langsamen Komponente machen. Qualitativ kann eine Verkürzung von ca. 3.5 ps auf 1.7 ps angegeben werden. Der konstante Sockel positiver Absorption zu späten Zeiten kann durch die Existenz einer P^+ -Bande erklärt werden. Es ist möglich, daß diese Bande, deren Maximum beim Wildtyp bei 1300 nm liegt, bei der Mutante zu kürzeren Wellenlängen verschoben ist, und deshalb Ausläufer dieser Bande die Absorptionseigenschaften auch bei 1020 nm beeinflussen.

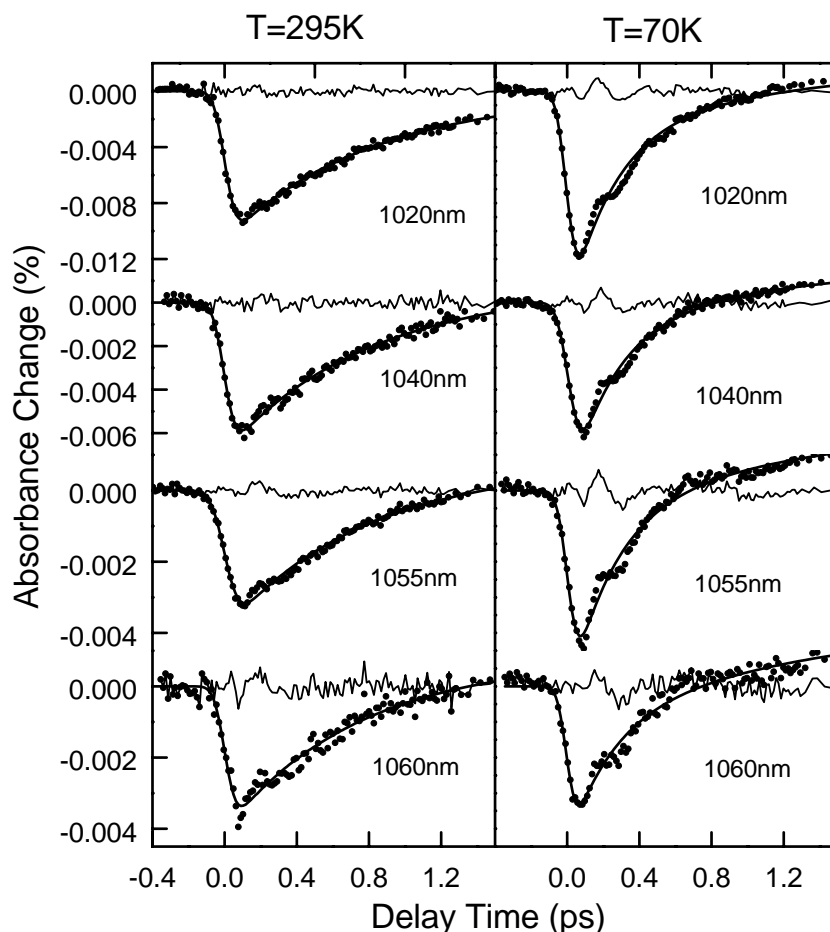


Abbildung 5.11: Wellenlängenabhängige Messungen der Mutante L168HF bei Raumtemperatur (links) und bei 70 K (rechts), die Anpassung der Meßpunkte erfolgte über den ganzen Wellenlängenbereich mit den Zeitkonstanten $\tau_{1a} = 0.72$ ps und $\tau_{1b} = 3.5$ ps bei Raumtemperatur, und $\tau_{1a} = 0.25$ ps und $\tau_{1b} = 1.5$ ps bei $T = 70$ K.

5.4.1.2 Wellenlängenabhängigkeit

Auch bei der Mutante wurden wieder bei Raumtemperatur und bei 70 K Messungen bei verschiedenen Abtastwellenlängen mit besonders guter Zeitauflösung vorgenommen (siehe Abbildung 5.11 und Tabelle 5.5). Wie beim Wildtyp wurden die Meßdaten mit den bei Raumtemperatur bzw. 70 K bei $\lambda_{pr} = 1020$ nm bestimmten Zeiten angepaßt.

λ_{pr} (nm)	$A(\tau_{1a})/A(\tau_{1b})$ (RT)	$A(\tau_{1a})/A(\tau_{1b})$ (70 K)
1020	3.0	2.5
1040	3.4	2.4
1055	4.5	1.9
1060	11.5	1.1

Tabelle 5.5: Amplitudenverhältnis bei biexponentieller Datenanpassung mit den Zeitkonstanten $\tau_{1a} = 0.72$ ps und $\tau_{1b} = 3.5$ ps bei Raumtemperatur und $\tau_{1a} = 0.25$ ps und $\tau_{1b} = 1.5$ ps bei $T = 70$ K bei wellenlängenabhängigen Messungen im Bereich der stimulierten Emission zwischen $\lambda_{pr} = 1020$ nm und 1060 nm.

Durch Subtraktion der Meßpunkte vom Fit erhält man wieder die Residuen, die durch Fouriertransformation Aufschluss über eventuell vorhandene Oszillationsfrequenzen geben. Wie man in Abbildung 5.11 sehen kann, sind bei Raumtemperatur bei 1020 nm und bei 1040 nm keine Oszillationen vorhanden, erst bei 1055 nm sind andeutungsweise Oszillationen kurz nach dem Zeitnullpunkt zu beobachten, deren Amplitude bei 1060 nm zwar relativ zur Gesamtamplitude wächst, durch das schlechtere Signal-zu-Rausch-Verhältnis kann die Frequenz allerdings nur schlecht bestimmt werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Messungen bei 70 K über den ganzen Wellenlängenbereich Oszillationen, deren Frequenz aus den Fouriertransformationen gut bestimmt werden kann (siehe Abbildung 5.12). Die gefundenen Oszillationsfrequenzen liegen wie im Wildtyp bei ca. 56 cm^{-1} und 145 cm^{-1} .

5.4.2 Messungen im Bereich der B-Bande

Die Messungen im Bereich der B-Bande erwiesen sich als äußerst schwierig, da das Meßsignal relativ klein im Vergleich zum Rauschen war. Es wurden wie beim Wildtyp temperaturabhängige Kurven bei ca. 823 nm aufgenommen, um die zweite Elektronentransferzeit vom Zustand P^+B^- nach P^+H^- zu bestimmen (siehe Abb. 5.13).

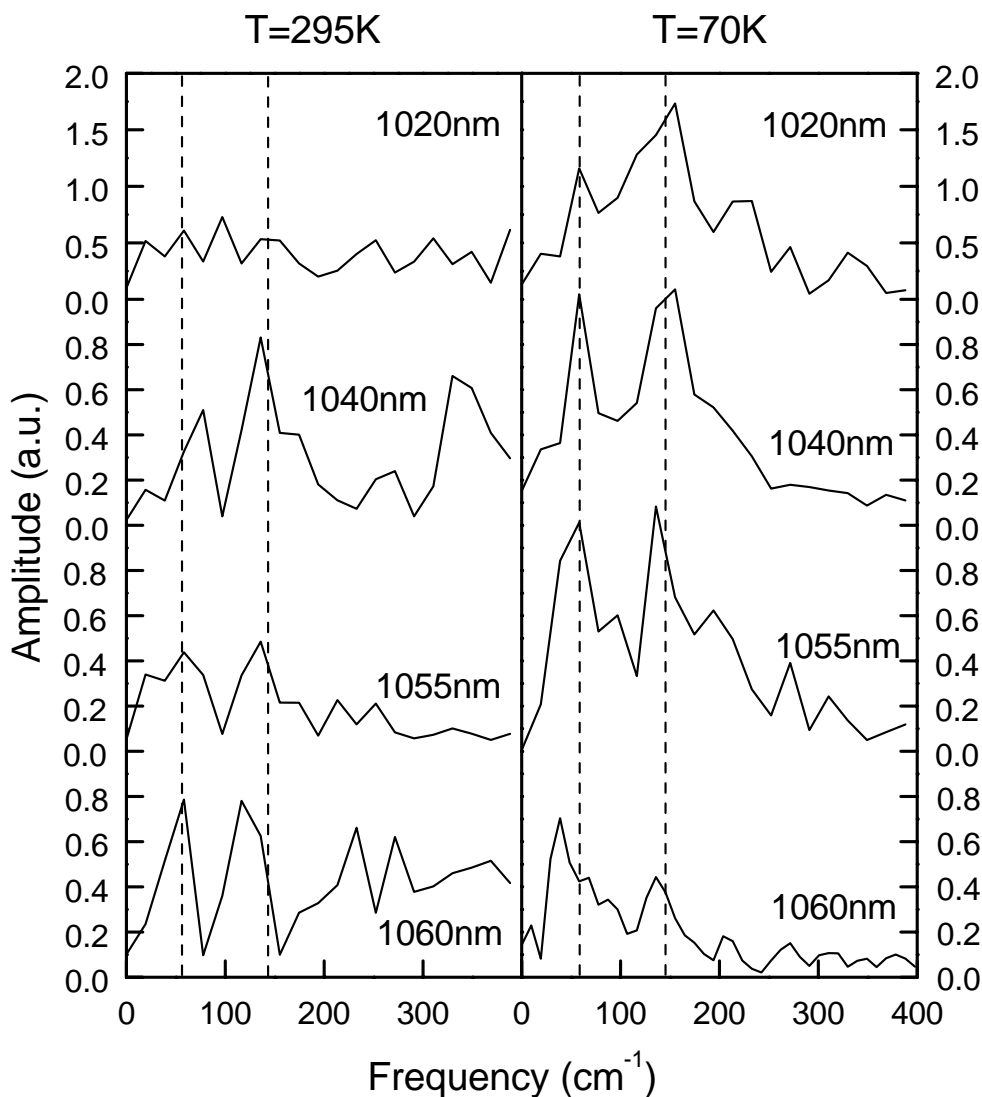


Abbildung 5.12: Fouriertransformation der Residuen für die wellenlängenabhängigen Meßkurven bei Raumtemperatur (links) und bei $T = 70\text{ K}$ (rechts). Die gestrichelten Linien zeigen die über den ganzen Wellenlängenbereich konstanten Bandenmaxima bei 56 cm^{-1} und 145 cm^{-1} .

Um die genaue Lage des isobestischen Punktes zu bestimmen, wurden bei $T = 100\text{ K}$ wellenlängenabhängige Messungen durchgeführt (Abbildung 5.14). Diese Messungen zeigen eindrucksvoll, wie stark sich das Meßsignal in diesem Bereich bei Änderung um nur wenige nm verändert. Da im Bereich des isobestischen Punktes auch der erste Transfer von P^* nach P^+B^- als Absorptionsabnahme in der B-Bande beobachtet werden kann, und dieser im Vergleich zum Wildtyp viel schneller ist,

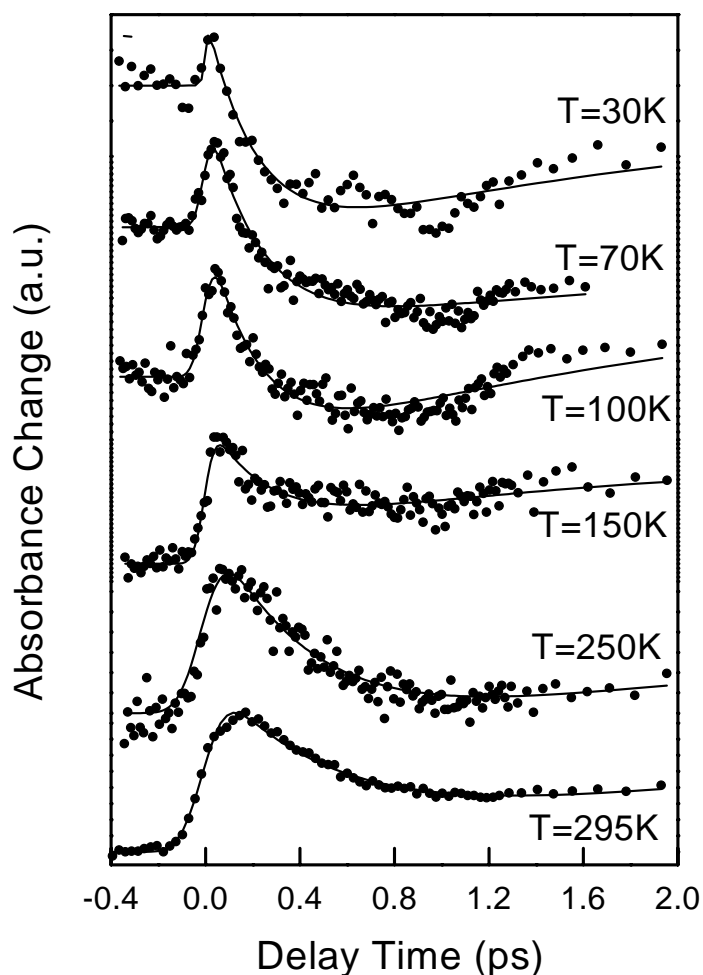


Abbildung 5.13: Temperaturabhängige Messungen der Mutante L168HF am isosbestischen Punkt der B-Bande. Die Anpassung erfolgte mit den Zeiten τ_{1a} und τ_{1b} , die im Bereich der stimulierten Emission bestimmt wurden, mit der Zeit τ_2 (siehe Tabelle 5.8) und τ_3 .

ist es bei der Mutante nahezu unmöglich, die zweite Elektrontransferzeit genau zu bestimmen. Geht man davon aus, daß die Mutation nur die Umgebung des Special Pairs betrifft, sollte die τ_2 -Zeit von der Mutation nicht betroffen sein, und es sollten die gleichen Werte gelten, die bei den Wildtypreaktionszentren bestimmt wurden. Eine Anpassung der Meßdaten mit den Zeiten τ_{1a} und τ_{1b} aus den Messungen im Bereich der stimulierten Emission der Mutante L168HF und den Werten für τ_2 aus den Wildtypmessungen ergaben eine befriedigende Wiedergabe der Meßpunkte. Dies

bestätigt, daß die Mutation den zweiten Elektrontransferschritt nicht beeinflußt, und die Temperaturabhängigkeit der τ_2 -Zeit für Wildtyp und Mutante ähnlich sind. Leider waren keine Aussagen über Oszillationen in diesem Bereich möglich.

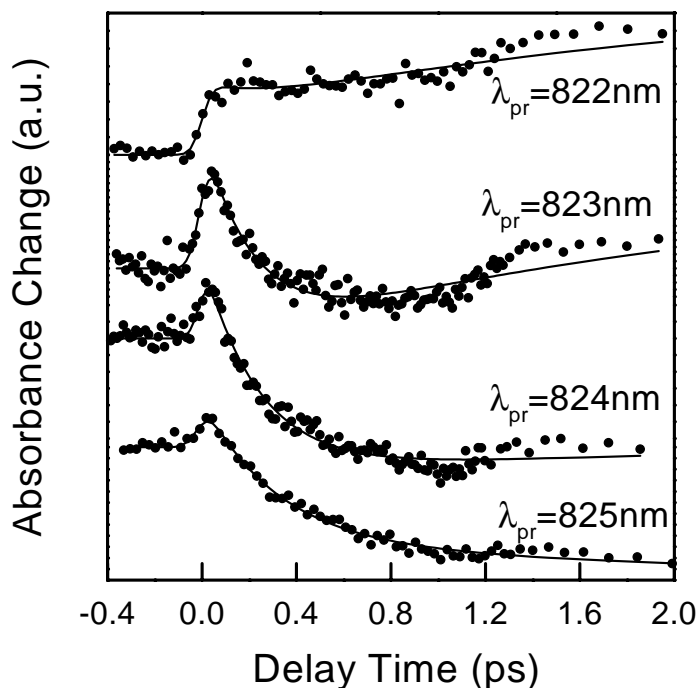


Abbildung 5.14: Meßkurven im Bereich der B-Bande zur Bestimmung des isosbestischen Punkts bei $T = 100$ K.

5.5 Diskussion

Eine qualitative Anpassung der temperaturabhängigen Raten mit der Hopfieldformel (Gleichung 2.7) liefert Parametersätze für die Schwingungsmode, die freie Energie, die Reorganisationsenergie und die Kopplung für den ersten und den zweiten Elektrontransferschritt von Wildtyp und Mutante. Die Frage, ob der Elektronentransfer rein nichtadiabatisch oder in Grenzfällen auch adiabatisch ist, wird anhand der Temperaturabhängigkeit in Kombination mit einer genauen Analyse der kohärenten Prozesse diskutiert.

5.5.1 Temperaturabhängigkeit

5.5.1.1 Der Zerfall des angeregten Zustands P*

Durch die temperaturabhängigen Messungen am Wildtyp und der Mutante L168HF sollten Werte für den Unterschied der freien Energie ΔG zwischen dem ersten angeregten Zustand P* und P⁺B⁻, der Reorganisationsenergie λ , der mittleren Schwingungsenergie $\hbar\omega$ und der elektronischen Kopplung V^2 abgeschätzt werden. Man nimmt dazu in erster Näherung an, daß ΔG , λ und $\hbar\omega$ temperaturunabhängig sind. In Tieftemperaturmessungen an nativen und mutierten Reaktionszentren von *Rhodobacter sphaeroides* wurden Werte für λ in der Größenordnung von 440 cm^{-1} und $\hbar\omega$ von etwa 110 cm^{-1} für den ersten Elektrontransferschritt bestimmt [Hub97]. Für die hier untersuchten Reaktionszentren sollten sich die Werte in der gleichen Größenordnung bewegen. Abbildung 5.15 zeigt die Temperaturabhängigkeit der τ_{1a} -

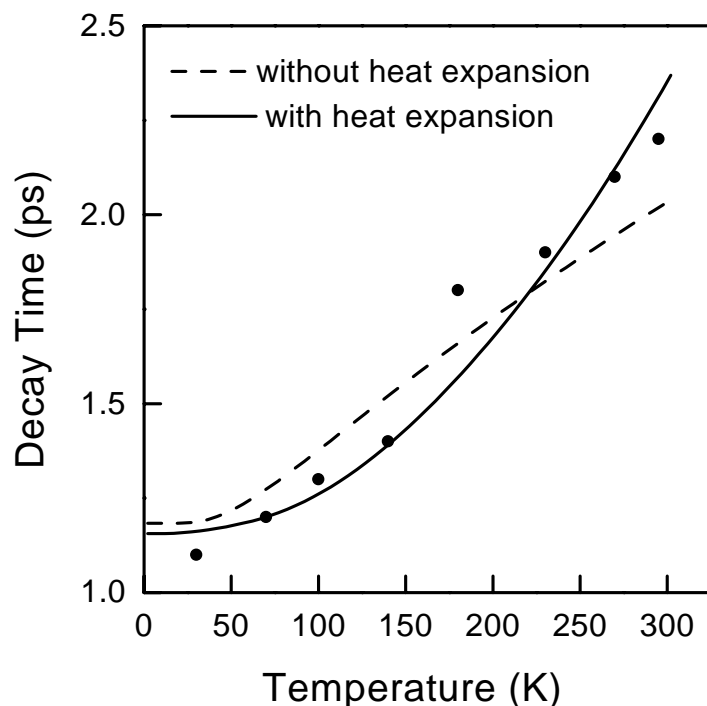


Abbildung 5.15: Temperaturabhängigkeit der τ_{1a} -Zeit des Wildtyps. Die Datenanpassung erfolgte mit Gleichung 2.7 und den Werten aus Tabelle 5.6.

Zeit des Wildtyps, die bei biexponentieller Datenanpassung bei allen Temperaturen

im Vergleich zur τ_{1b} -Zeit die größere Amplitude hatte. Berücksichtigt man eine temperaturabhängige Änderung der elektronischen Kopplung V nach Gleichung 2.12 und 2.14, so lassen sich die Daten mit der nichtadiabatischen semiklassischen Hopfieldformel 2.7 mit folgenden Parametern anpassen:

$\hbar\omega$	ΔG	$V(300\text{ K})$	λ	α	β	$R(300\text{ K})$
60 cm^{-1}	-450 cm^{-1}	21 cm^{-1}	600 cm^{-1}	1.8	1.4 \AA^{-1}	10.6 \AA

Tabelle 5.6: Parameter für die Anpassung der Zerfallszeit τ_{1a} des Wildtyps.

Die mittlere Schwingungsmode $\hbar\omega$ liegt mit 60 cm^{-1} zwischen dem im Wildtyp von *Rhodobacter sphaeroides* bestimmten Wert von 110 cm^{-1} [Hub97] und dem von Fleming et al. bei der Anpassung der Tieftemperaturdaten von *Rps. viridis* verwendeten Wert von 25 cm^{-1} [Fle88]. Warshel hat berechnet, daß die intramolekulare Bewegung des Special Pairs bei etwa 100 cm^{-1} liegen sollte [War80]. Die hier zur Anpassung der Tieftemperaturdaten gefundene mittlere Frequenz von $60 \pm 20\text{ cm}^{-1}$ ist also ein realistischer Wert. Auch der Wert für die Reorganisationsenergie $\lambda = 600\text{ cm}^{-1}$ liegt in der richtigen Größenordnung. Die Anpassung der Raumtemperaturzerfallszeiten von nativen und mutierten Reaktionszentren von *Rps. viridis* mithilfe der Marcusrelation (siehe Gleichung 2.4) ergab $\lambda = 770\text{ cm}^{-1}$ [Arl96a]. Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Kopplung mithilfe von Gleichung 2.14 wurde der durch Röntgenstrukturanalyse bekannte „centre-to-centre“-Abstand zwischen Special Pair und B_A verwendet. Die am Myoglobin gemessene Abstandsänderung mit der Temperatur wurde mit einem Vorfaktor α gewichtet, um einen Unterschied in der temperaturabhängigen Ausdehnung zwischen Myoglobin und dem hier verwendeten Reaktionszentrum zu ermöglichen. Der bei der Datenanpassung gefundene Wert von $\alpha = 1.8$, bedeutet, daß sich das Reaktionszentrum bei Erwärmung 1.8 mal stärker ausdehnt, als Myoglobin. Da es noch keine temperaturabhängigen Strukturmessungen an Reaktionszentren gibt, kann dieser Unterschied nicht ausgeschlossen werden. Wie schon in Kapitel 2 erwähnt wurde der Exponentialkoeffizient β für intraproteinen Elektronentransfer zu 1.4 \AA^{-1} bestimmt. Der für die freie Energie ΔG ermittelte Wert von -450 cm^{-1} bedeutet, daß der Hauptanteil des ersten Elektronentransferschrittes des Wildtyps leicht aktiviert ($-\Delta G < \lambda$) stattfindet. Die Aktivierungsenergie E_A ergibt sich nach Gleichung 2.1 zu: $E_A = 9.4\text{ cm}^{-1}$. Das aktivierte Verhalten des Wildtyps von *Rps. viridis* konnte auch schon anhand von Raumtem-

peraturmessungen am Wildtyp und verschiedenen Mutanten gezeigt werden.

Betrachtet man die langsamere Komponente bei biexponentieller Datenanpassung, so erhält man ein genau gegenläufiges Verhalten (siehe Abbildung 5.16): von 12 ps bei Raumtemperatur verlangsamt sich die Reaktion kontinuierlich bis zu 37 ps bei 30 K. Dies deutet auf erhebliche Änderungen von ΔG , bzw. λ und damit der Ak-

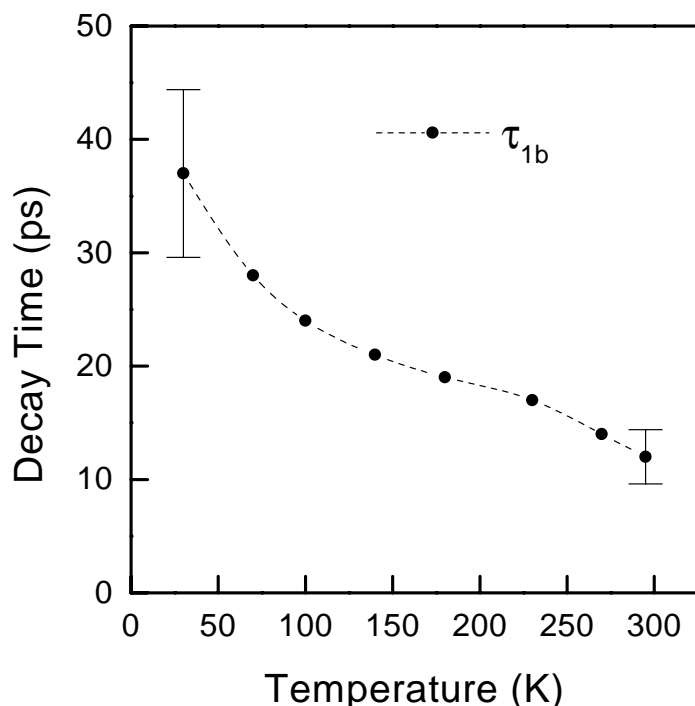


Abbildung 5.16: Temperaturabhängigkeit der τ_{1b} -Zeit des Wildtyps: die Meßpunkte sind mit einem Spline verbunden, da keine Datenanpassung mit der Hopfieldformel möglich war.

tivierungsenergie hin. Da man bei der biexponentiellen Datenanpassung davon ausgeht, daß die energetische Lage des Zustandes P^+B^- breit verteilt ist (siehe Kapitel 5.3.1), liegt hier die Vermutung nahe, daß die langsame biexponentielle Komponente diejenigen Reaktionszentren widerspiegelt, bei denen der Zustand $P^+B_A^-$ energetisch angehoben ist.

Trägt man die Elektrontransferzeit der Mutante L168HF gegen die Temperatur auf, so erkennt man eine starke Beschleunigung der Elektrontransferzeit zwischen Raumtemperatur und 150 K, und eine schwächere Änderung bei tiefen Temperaturen (siehe Abbildung 5.17). Dieses Temperaturverhalten kann nicht zufriedenstellend

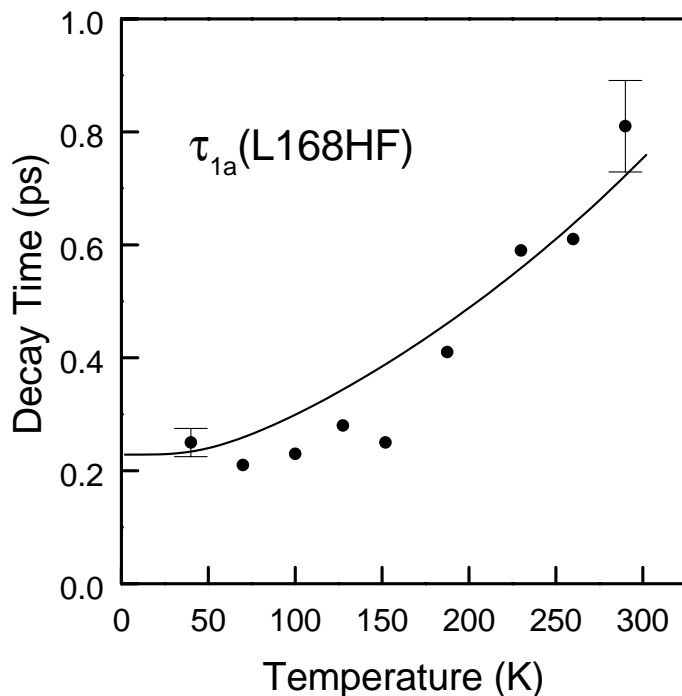


Abbildung 5.17: Temperaturabhängigkeit der τ_{1a} -Zeit der Mutante L168HF: durchgezogene Linie: Datenanpassung mit der Hopfieldformel (Gleichung 2.7) mit den Werten aus Tabelle 5.7.

mit Gleichung 2.7 angepasst werden. Die beste Datenanpassung erzielt man mit folgenden Werten:

$\hbar\omega$	ΔG	$V(300 K)$	λ	α	β	$R(300 K)$
60 cm^{-1}	-600 cm^{-1}	37 cm^{-1}	600 cm^{-1}	3	1.4 \AA^{-1}	10.6 \AA

Tabelle 5.7: Parameter für die Anpassung der Zerfallszeit τ_{1a} der Mutante L168HF.

Mit $-\Delta G = \lambda$ befindet man sich hier im aktivierungslosen Bereich. Dies stimmt mit Ergebnissen aus Raumtemperaturmessungen überein. Allerdings scheint der Wert von $\alpha = 3$, der zur Datenanpassung benötigt wurde, verglichen mit dem Wert für $\alpha = 1.8$ beim Wildtyp unrealistisch groß. Wie man anhand der stationären Spektren sehen konnte, ist die excitonische Kopplung zwischen den beiden Bacteriochlorophyllen des Special Pairs kleiner als beim Wildtyp. Die elektronische Kopplung zwischen dem Special Pair P und dem Bacteriochlorophyllmonomer B_A ist schon bei

Raumtemperatur deutlich größer, was sich in einer Beschleunigung des primären Elektronentransfers von 2 ps im Wildtyp auf 0.8 ps in der Mutante auswirkt. Der Wert von $\alpha = 3$ wäre eventuell über die größere Flexibilität des Special Pairs in der Mutante durch Entfernung der Wasserstoffbrückenbindung zu erklären. Diese größere Flexibilität der Moleküle könnte sich allerdings auch in einer Verkleinerung der Reorganisationsenergie λ äussern. Versuche, die Meßdaten mit temperaturabhängigen λ anzupassen, erfordern jedoch gleichzeitig eine temperaturabhängige Variation der Kopplung V , und lassen keine neuen physikalischen Aussagen zu. Betrachtet man die langsame Komponente der Zerfallszeit τ_{1b} der Mutante L168HF, so zeigt diese eine schwache Temperaturabhängigkeit, die wie beim Wildtyp erklärt werden kann. Allerdings ist aufgrund der kleinen Amplitude der τ_{1b} -Zeit der Mutante eine detaillierte Datenanpassung nicht sinnvoll. Es kann nur gesagt werden, daß vermutlich ähnlich wie beim Wildtyp die τ_{1b} -Zeit diejenigen Reaktionszentren widerspiegelt, bei denen die Energie des Akzeptorzustandes P^+B^- etwas höher liegt, so daß also in diesem Fall ein leicht aktivierter Elektronentransfer vorliegt.

5.5.1.2 Der Zerfall des Zustands P^+B^-

Trägt man die Zerfallszeit des Zustands P^+B^- (τ_2) des Wildtyps gegen die Temperatur auf, so erhält man einen ähnlichen Verlauf, wie bei der τ_{1a} -Zeit der Mutante L168HF (siehe Abbildung 5.18). Eine Anpassung der Meßdaten mit der semiklassischen Hopfieldformel führt zu folgenden Ergebnissen:

$\hbar\omega$	ΔG	$V(300 K)$	λ	α	β	$R(300 K)$
60 cm^{-1}	-1400 cm^{-1}	39 cm^{-1}	1400 cm^{-1}	5.8	1.4 \AA^{-1}	9 \AA

Tabelle 5.8: Parameter für die Anpassung der Zerfallszeit τ_2 des Wildtyps.

Der zweite Elektronentransferschritt ist ebenfalls ein aktivierungsloser Prozeß ($E_A = 0 \text{ cm}^{-1}$). Ab initio Rechnungen der elektronische Kopplung sagen für den zweiten Elektronentransferschritt von B_A nach H_A eine etwa dreimal stärkere Kopplung voraus, wie für den ersten Elektronentransferschritt. Die Anpassung der Elektronentransferzeiten mit der Hopfieldformel ergibt bei Raumtemperatur eine etwa doppelt so große Kopplung. Da der zweite Elektronentransferschritt aktivierungslos erfolgt, sollte die Reorganisationsenergie λ etwa genauso groß sein, wie der Unterschied der

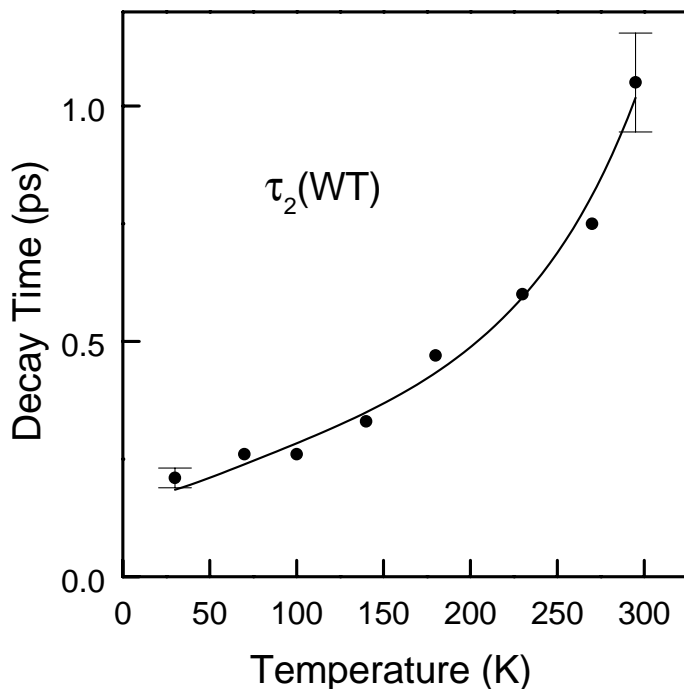


Abbildung 5.18: Temperaturabhängigkeit der τ_2 -Zeit des Wildtyps. Die Datenanpassung erfolgte mit Gleichung 2.7 und den Werten aus Tabelle 5.8.

freien Energie ΔG . Für $\Delta G_{P^*-P+H^-}$ wurde von Ogrodnik ein Wert von -2000 cm^{-1} vorhergesagt [Ogr90]. Da für $\Delta G_{P^*-P+B^-}$ etwa 600 cm^{-1} abgeschätzt wurden (siehe oben), ergibt sich für ΔG_{P+H^-} ein Wert von ca. 1400 cm^{-1} . Die Reorganisationsenergie sollte auch bei 1400 cm^{-1} liegen, weil der zweite Elektronentransferschritt aktivierungslos ist.

Wie oben erwähnt, ist die Temperaturabhängigkeit der τ_2 -Zeit in der Mutante L168HF ähnlich wie im Wildtyp, da die Mutation den zweiten Elektronentransferschritt nicht beeinflusst. Für den Transfer von P^+B^- nach P^+H^- in der Mutante sollten dann die gleichen Werte gelten wie im Wildtyp.

5.5.2 Kohärente Effekte

Seit der ersten Beobachtung von kohärenten Schwingungen in bakteriellen Reaktionszentren in einer Mutante von *Rhodobacter capsulatus* und in *Rhodobacter sphaeroides* Anfang der 90er Jahre von Vos et al [Vos91], stellt sich immer noch die Frage, ob die im Bereich der stimulierten Emission von P^* beobachteten Oszillatio-

nen entlang der Reaktionskoordinate für den Elektronentransfer erfolgen. Messungen verschiedener Gruppen an unterschiedlichen Reaktionszentren konnten diese Frage noch nicht eindeutig beantworten. Die im Folgenden diskutierten Meßergebnisse sind die ersten, bei denen Oszillationen am Wildtyp und an der Mutante L168HF des Bakteriums *Rps. viridis* beobachtet werden konnten. Wie in Abbildung 5.7 zu sehen ist, können im Wildtyp von *Rps. viridis* bei Raumtemperatur zwei Oszillationsfrequenzen beobachtet werden: eine über den ganzen gemessenen Wellenlängenbereich dominante Frequenz von 145 cm^{-1} (dies entspricht einer Periode von 230 fs) und eine Frequenz von 56 cm^{-1} (entspricht einer Periode von 595 fs). Während auch bei $T = 70\text{ K}$ die 145 cm^{-1} -Komponente vorhanden ist, fehlt hier die niederfrequente Mode bei 56 cm^{-1} . Ab 1080 nm scheint eine noch niederfrequenter Mode bei ca. 35 cm^{-1} aufzutreten. Auffällig ist auch das Fehlen jeglicher Oszillation bei einer Abtastwellenlänge $\lambda_{pr} = 1020\text{ nm}$. Bei dieser Abtastwellenlänge befindet man sich offensichtlich genau im Minimum der S_1 -Potentialfläche, also im Maximum der stimulierten Emission. Hier müßte die Oszillation etwa die doppelte Frequenz aufweisen, da das Wellenpaket zweimal pro Schwingung diesen Punkt passiert. Dies entspräche einer Oszillationsfrequenz von ca. 115 fs. Da außerdem die Amplitude der Schwingung bei 1020 nm sehr klein wäre, so kann man diese Schwingung mit der hier verwendeten Zeitauflösung (Kreuzkorrelationsbreite 90 fs) nicht mehr auflösen.

Vergleicht man die Oszillationsamplituden relativ zur Gesamtsignalhöhe, so beobachtet man eine Zunahme der Amplitude zu längeren Abtastwellenlängen, und eine generell größere Amplitude bei tiefen Temperaturen. Auch hier findet man die gleiche Abhängigkeit von der Abtastwellenlänge, wie bei Raumtemperatur. Die Zeitkonstante für die Dämpfung der Oszillationen liegt im Wildtyp bei Raumtemperatur bei 350 fs bei 1040 nm und ca. 800 fs bei 1100 nm, bei $T = 70\text{ K}$ ist sie im gleichen Zeitbereich: sie liegt für alle Wellenlängen zwischen 400 fs und 500 fs. Diese Beobachtung steht zwar im Widerspruch zu Messungen von Vos et al. an einer langlebigen Mutante von *Rb. sphaeroides* [Vos96], die eine temperaturunabhängige Dämpfungskonstante von ca. 2 ps berichten¹, jedoch waren die Oszillationen in Messungen von Spörlein et al. an Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* auch mit einer Zeitkonstante zwischen 400 fs und 800 fs gedämpft [Spö98].

Generell kann man davon ausgehen, daß eine Temperaturänderung sowohl die Entstehung des Wellenpaketes als auch dessen Dämpfung beeinflußt. Die Entstehung

¹Vos et al. ermitteln die Dämpfungskonstante aus der Analyse der Halbwertsbreite der Fourier-spektren. Da in dieser Arbeit im gleichen Frequenzbereich vier Banden zu beobachten sind, ist die Halbwertsbreite der einzelnen Bande relativ schwer zu ermitteln.

des Wellenpakets ist bei tiefen Temperaturen im Wesentlichen durch die spektrale Breite des Anregungsimpulses bestimmt, da z.B. bei $T = 70\text{ K}$ die thermische Verteilung (70 K entspricht 48 cm^{-1}) deutlich kleiner ist, als die Bandbreite des Anregungsimpulses (40 nm entspricht 425 cm^{-1}). Bei Raumtemperatur spielt die Boltzmannverteilung (209 cm^{-1} bei 300 K) des Grundzustandes eine zusätzliche Rolle. Da die thermische Boltzmannverteilung zu einer Ausschmierung der Anfangsbedingung führt, weisen die bei Raumtemperatur präparierten Wellenpakete eine kleinere Amplitude auf.

Die Dämpfung der Wellenpaketsbewegung hängt stark von der Kopplung an die Umgebung (im Fall des Reaktionszentrums: das Proteingerüst und das Lösungsmittel) ab. Elastische und inelastische Stöße zerstören die Phasenbeziehung in dem beobachteten Ensemble von Molekülen und führen so zu einer Dämpfung der Oszillationen. Bei tieferen Temperaturen finden wahrscheinlich weniger Stöße statt, deshalb ist die Wellenpaketsbewegung weniger gedämpft als bei Raumtemperatur. Auch trägt bei allen Temperaturen die Existenz verschiedener Frequenzen im Wellenpaket zur Dephasierung bei. Nicht erklärbar sind so allerdings die langen Dämpfungszeiten, die bei Raumtemperatur im Langwelligen, bei 1060 nm und 1100 nm (jeweils ca. 800 fs) gefunden werden. Alle hier beobachteten Zeitkonstanten für die Dämpfung sind kürzer als die Elektronentransferzeit bei der jeweiligen Temperatur. Dies bedeutet, daß der Elektronentransfer von einem relaxierten Zustand aus stattfindet und damit nichtadiabatisch ist (siehe Kapitel 2, Fall a) oder b) in Abbildung 2.9). Wie in Abbildung 5.9 zu sehen war, findet man bei Messungen in der B-Bande, also im Absorptionsbereich des Elektronenakzeptors, die gleichen Frequenzen wie bei Messungen im Bereich der stimulierten Emission. Dies könnte als Hinweis dafür gewertet werden, daß diese Moden an den Elektronentransfer koppeln, daß also für den Wildtyp Fall b) in Abbildung 2.9 angenommen werden muß.

Während die Primärreaktion der Mutante L168HF durch die Mutation stark beeinflusst wurde, zeigen die Oszillationen in der Mutante qualitativ ein ähnliches Verhalten wie im Wildtyp: Auch in der Mutante sind die Oszillationen bei $T = 70\text{ K}$ stärker ausgeprägt als bei Raumtemperatur, und die Amplitude der Oszillationen nimmt bei längeren Wellenlängen zu. Allerdings können im Vergleich zum Wildtyp bei Raumtemperatur kaum Oszillationen aufgelöst werden. Die Fourieranalyse der Oszillationen der Mutante zeigt ähnliche Frequenzen wie im Wildtyp, nämlich 145 cm^{-1} und 56 cm^{-1} . Bei $T = 70\text{ K}$ zeigt sich bei allen Abtastwellenlängen eine deutliche Modulation des Meßsignals. Da die Wellenpaketsbewegung bei tiefen Temperaturen schon bei $\lambda_{pr} = 1020\text{ nm}$ deutlich ist, muß davon ausgegangen werden,

daß das Maximum der stimulierten Emission der Mutante leicht blauverschoben ist ($\lambda = 1000$ nm) oder hier eine modulierte Abnahme der Besetzung von P^* durch adiabatischen Elektronentransfer auftritt. Bei $\lambda_{pr} = 1000$ nm konnten wegen des spektralen Überlapps mit dem breiten Anregungspuls (zentriert um 970 nm, 40 nm breit) leider keine Messungen durchgeführt werden.

Die Dämpfung der Wellenpaketsbewegung in der Mutante liegt im Bereich von ca. 200 fs - 300 fs. Da die Zerfallszeit des Zustandes P^* bei tiefen Temperaturen in der gleichen Größenordnung liegt, kann hier nicht mehr unterschieden werden, ob die Wellenpaketsbewegung durch elastische oder inelastische Stöße gedämpft ist (siehe Kapitel 2, Fall a) in Abbildung 2.9), oder ob die Abnahme der Population im angeregten Zustand alleiniger Auslöser für die Dämpfung ist (siehe Kapitel 2, Fall b) in Abbildung 2.9). Wenn der Elektronentransfer so schnell ist, daß das Wellenpaket im Donorzustand nicht mehr vor dem Elektronentransfer relaxieren kann, muß für einen Teil der Reaktionen eventuell sogar der adiabatische Fall c) in Kapitel 2, Abbildung 2.9 in Betracht gezogen werden. Diese Beobachtungen führen direkt zur gegenwärtig zentralen Fragestellung: ist der Elektronentransfer der Mutante L168HF bei tiefen Temperaturen noch nichtadiabatisch?

5.5.3 Der Vergleich zwischen nichtadiabatischem und adiabatischem Elektronentransfer

Ein Kriterium für nichtadiabatischen Elektronentransfer war die vollständige Schwingungsrelaxation im Donorzustand, so daß die Besetzung der Schwingungsniveaus durch die Boltzmannverteilung gegeben ist. Wie man an den Tieftemperaturmeßkurven der Mutante L168HF sieht, ist diese Bedingung nicht mehr gegeben: die Oszillationen können bei den Tieftemperaturmeßkurven solange beobachtet werden, bis die Population des angeregten Zustandes P^* vollständig zerfallen ist. Bei Temperaturen kleiner 150 K liegt die Relaxationszeit der Oszillationen mit ca. 200 fs im Bereich der Zerfallszeit $\tau_{1a} = 250$ fs, während beim Wildtyp längere Dämpfungszeiten von ~ 500 fs gefunden worden waren. Diese oben angegebene Bedingung für nichtadiabatischen Elektronentransfer ist also sicherlich nicht mehr erfüllt [Hup98]. Ein weiteres Kriterium für die Unterscheidung zwischen nichtadiabatischem und adiabatischem Elektronentransfer ist die Berechnung des Landau-Zener-Faktors γ_{LZ} (siehe Kapitel 2). Abbildung 5.19 zeigt die Temperaturabhängigkeit des Landau-Zener-Faktors für Wildtyp und Mutante, die man erhält, wenn man die temperaturabhängige Kopplung und die anderen Parameter, die man aus den temperaturabhängigen Mes-

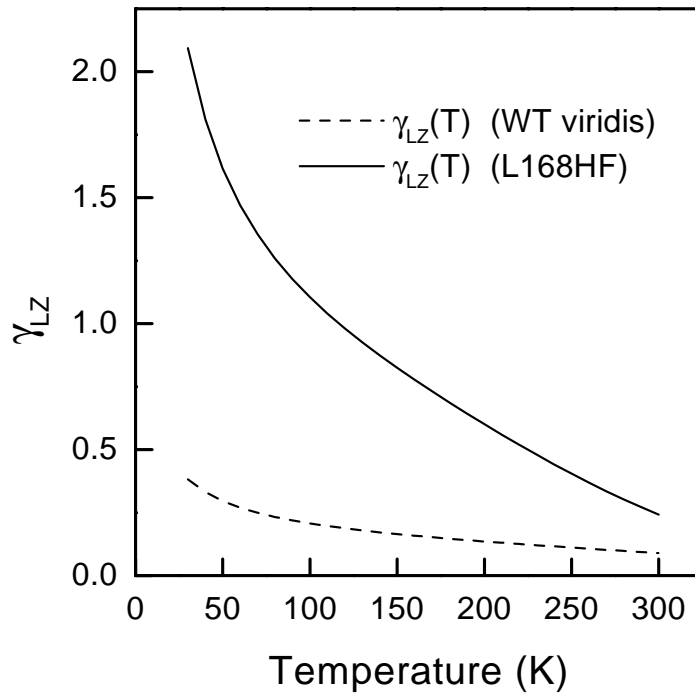


Abbildung 5.19: Temperaturabhängigkeit des Landau-Zener-Faktors γ_{LZ} für Wildtyp und Mutante.

sungen im Bereich der stimulierten Emission erhält, in Gleichung 2.11 einsetzt. Wie man an der Abbildung unschwer erkennen kann, liegt der Elektronentransfer des Wildtyps über den ganzen gemessenen Temperaturbereich im nichtadiabatischen Bereich, während γ_{LZ} der Mutante ab Temperaturen < 150 K in der Größenordnung von 1 liegt, der Elektronentransfer somit adiabatisch ist. Bestärkt wird diese Annahme, durch die Beobachtung, daß der Elektronentransfer der Mutante bei tiefen Temperaturen ($T < 150$ K) keine weitere Beschleunigung mehr aufweist. Wie Gleichung 2.9 zeigt, ist dies für aktivierungslosen adiabatischen Elektronentransfer der Fall. Die Rate ist dann allein durch die Schwingungsmode bestimmt: $k = \omega/2\pi$. Nachdem beim ersten Elektronentransferschritt der Mutante L168HF offensichtlich bei hohen Temperaturen noch nichtadiabatischer Elektronentransfer dominiert, der Transfer bei Temperaturen kleiner als 150 K jedoch adiabatisch wird, wurde die Anpassung der Zerfallszeiten mit der allgemein gültigen Formel versucht 2.2.2.2. Hierbei ergibt sich jedoch keine signifikante Verbesserung gegenüber der nichtadiabatischen Nähe-

rung. Die hier gezeigten Bemühungen, die Temperaturabhängigkeiten der ersten beiden Elektronentransferschritte von Wildtyp und Mutante mithilfe herkömmlicher Theorien zu beschreiben, ist zwar qualitativ möglich, jedoch benötigt man zu einer guten Datenanpassung eine unrealistische Wahl der Parameter. Vor allem der Wert von α , der ein Maß für den Unterschied in der Wärmeausdehnung zwischen Myoglobin und Reaktionszentren darstellt, muß angezweifelt werden. Die Tatsache, daß dieser Unterschied zwischen Myoglobin und dem Wildtyp 1.8 beträgt, mag einleuchten, daß aber die Mutante L168HF eine 2.6 mal stärkere Wärmeausdehnung erfährt als der Wildtyp, obwohl nur eine Aminosäure im Proteingerüst ausgetauscht wurde, ist äußerst unrealistisch. Auch eine 3 mal stärkere Wärmeausdehnung für den zweiten Elektronentransferschritt von P^+B^- zu P^+H^- im Vergleich zur Primärreaktion ist schwer zu erklären. Deshalb wurde mit einer alternativen Theorie versucht, eine konsistente Datenanpassung zu erzielen.

5.5.4 Alternative Theorie zur Beschreibung der starken Beschleunigung der Reaktion bei tiefen Temperaturen

Nachdem weder mit der nichtadiabatischen noch mit der adiabatischen Theorie eine zufriedenstellende Anpassung der temperaturabhängigen Meßergebnisse erfolgen konnte, muß das Phänomen der Temperaturabhängigkeit beim Elektronentransfer in photosynthetischen Reaktionszentren auf andere Weise erklärt werden. Eine alternative Theorie, die die Temperaturabhängigkeit aller bisher beobachteten Elektronentransferschritte mit starker elektronischer Kopplung beschreibt, und außerdem die hohe Effektivität der Ladungstrennung in den Reaktionszentren erklärt, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. A. Scherz entwickelt und in Kapitel 2.2.3 vorgestellt. Abbildung 5.20 zeigt Anpassungen der Elektronentransferzeiten τ_{1a} und τ_2 des Wildtyps und τ_{1a} der Mutante L168HF. Für alle Elektronentransferschritte kann die gleiche mittlere Schwingung $\hbar\omega = 150 \text{ cm}^{-1}$ zur Anpassung benützt werden. Diese Schwingungsfrequenz stimmt mit der in allen Meßkurven beobachteten Frequenz von 145 cm^{-1} überein. Dies ist ein Hinweis dafür, daß ähnliche Moden des Reaktionszentrums für verschiedene Elektronentransferschritte verantwortlich sind. Der Energieunterschied ΔE zwischen den Subzuständen E_h und E_l liegt für alle Reaktionen zwischen 0.05 eV und 0.15 eV . Werte in dieser Größenordnung würde man für die Bildung einer schwachen Wasserstoffbrückenbindung oder für Fluktuationen, die durch thermische Bewegung des Proteins entstehen, erwarten. Die Entartung n der schwach koppelnden Zustände C_l ändert sich am drastischsten zwischen den

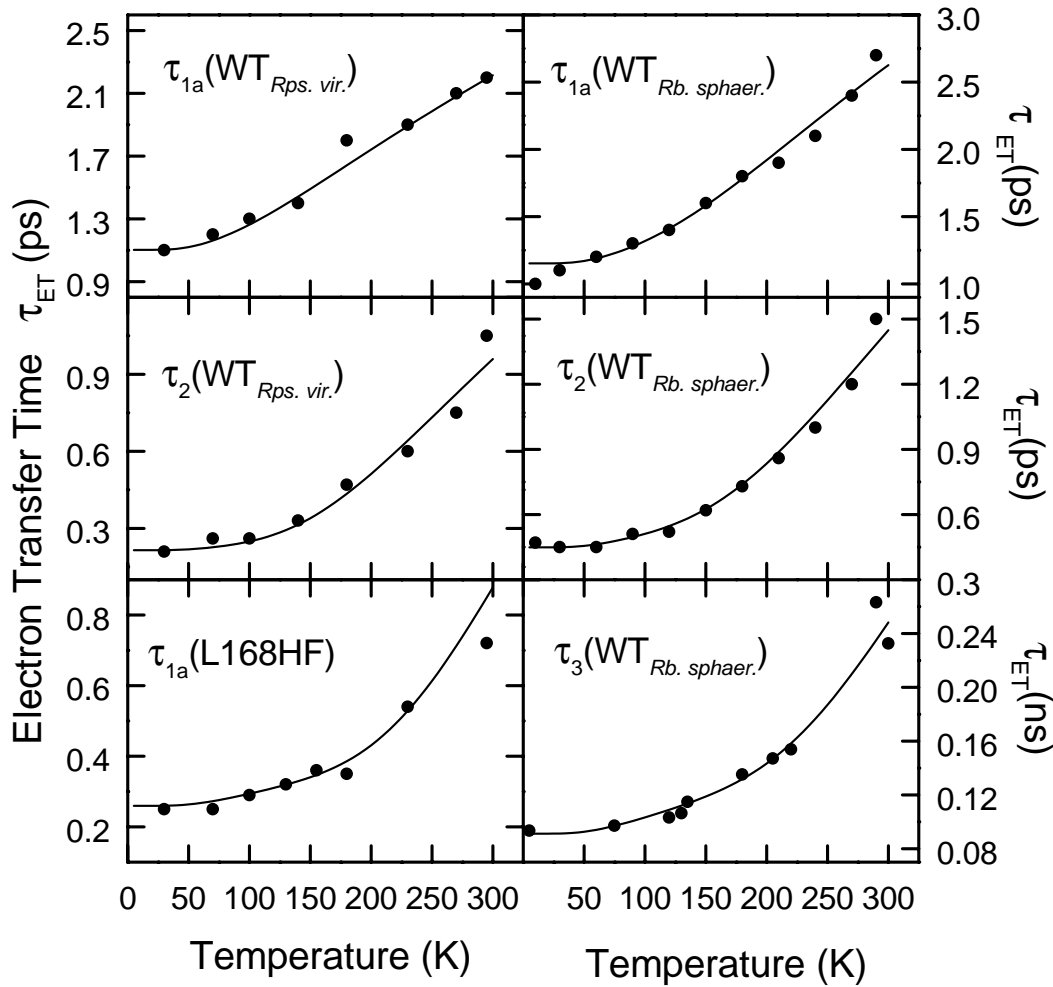


Abbildung 5.20: Anpassung der Zerfallszeiten mithilfe der Theorie aus Kapitel 2.2.3; links (von oben nach unten): τ_{1a} (WT_{*Rps. viridis*}), τ_2 (WT_{*Rps. viridis*}) und τ_{1a} (L168HF_{*Rps. viridis*}), rechts (von oben nach unten): τ_{1a} (WT_{*Rb. sphaeroides*}), τ_2 (WT_{*Rb. sphaeroides*}) und τ_3 (WT_{*Rb. sphaeroides*}).

verschiedenen Elektronentransferreaktionen. Vergleicht man die Elektronentransferzeiten τ_{1a} des Wildtyps von *Rps. viridis* und von *Rb. sphaeroides*, so lässt sich für beide Reaktionszentren eine Beschleunigung bei Temperaturabnahme feststellen, allerdings ist τ_{1a} (300K) bei *Rb. sphaeroides* mit ca. 3 ps etwas langsamer als in Reaktionszentren von *Rps. viridis* mit 2 ps. Mit abnehmender Temperatur wird die Elektronentransferzeit von Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* zuerst stärker beschleunigt als in *Rps. viridis*. Unterhalb von ca. 150 K zeigen beide Kurven einen ähnlichen Temperaturverlauf. Dies lässt sich im Rahmen des hier vorgestellten Mo-

dells gut erklären. In Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* befinden sich zwischen Proteingerüst und dem Special Pair P weniger Wasserstoffbrückenbindungen als an vergleichbarer Stelle in Reaktionszentren von *Rps. viridis*. Deshalb können Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* bei hohen Temperaturen mehr Konformationen C_l annehmen als Reaktionszentren von *Rps. viridis*. Wie man in Gleichung 2.15 sehen kann, erhöht sich dadurch der Beitrag der Rate k_l zur Gesamtrate, das bedeutet, daß die Elektronentransferzeit langsamer wird. Bei tiefen Temperaturen frieren sowohl bei Reaktionszentren von *Rps. viridis* als auch bei *Rb. sphaeroides* die Zustände mit kleiner Kopplung aus, übrig bleibt der Zustand mit optimaler Kopplung V_h , der für beide Reaktionszentren in etwa gleich ist. Für die Berechnung der Gesamtrate dominiert dann die Rate k_h (siehe Gleichung 2.16). Paßt man die Meßdaten mit Gleichung 2.16 an, so erhält man für die Reaktionszentren folgende Parameter:

	n	$\hbar\omega$	ΔE
$\tau_{1a}(\text{WT}(\textit{Rps. viridis}))$	4	150 cm ⁻¹	320 cm ⁻¹
$\tau_{1a}(\text{WT}(\textit{Rb. sphaeroides}))$	7	150 cm ⁻¹	400 cm ⁻¹
$\tau_{1a}(\text{L168HF}(\textit{Rps. viridis}))$	120	150 cm ⁻¹	890 cm ⁻¹
$\tau_2(\text{WT}(\textit{Rps. viridis}))$	30	150 cm ⁻¹	480 cm ⁻¹
$\tau_2(\text{WT}(\textit{Rb. sphaeroides}))$	30	150 cm ⁻¹	565 cm ⁻¹
$\tau_3(\text{WT}(\textit{Rb. sphaeroides}))$	80	150 cm ⁻¹	890 cm ⁻¹

Tabelle 5.9: Parameter für die Anpassung der Zerfallszeit τ_{1a} des Wildtyps von *Rps. viridis* und *Rb. sphaeroides* und der Mutante L168F von *Rps. viridis*, und der Zerfallszeit τ_2 des Wildtyps von *Rps. viridis* und *Rb. sphaeroides* und τ_3 des Wildtyps von *Rb. sphaeroides*.

Der größere Wert für die Entartung n der C_l -Zustände bei der Betrachtung des ersten Elektronentransferschrittes bei *Rb. sphaeroides* im Vergleich zu *Rps. viridis* bestätigt das oben erklärte Modell.

Auch der zweite, sehr schnelle Elektronentransferschritt von Reaktionszentren von *Rps. viridis* und *Rb. sphaeroides* läßt sich mit dieser Theorie gut anpassen. Die Schwingungsfrequenz ist für den zweiten Schritt die gleiche wie für den ersten, nur die Entartung der C_l -Zustände steigt auf etwa $n=30$. Dies ist nicht verwunderlich, da beim zweiten Schritt nicht nur der Elektronenakzeptor in verschiedenen Konformationen existieren kann, sondern auch der Elektronendonator. Es ist also zu erwarten, daß die Entartung wächst, je mehr Chromophore in die Reaktion einbezogen werden. Auch beim zweiten Elektronentransferschritt wird bei tiefen Temperaturen die

schnelle Rate k_h dominant, und die Elektronentransferzeit bleibt konstant.

In der Mutante L168HF von *Rps. viridis* wurde, wie schon erwähnt, eine Wasserstoffbrückenbindung zum Proteingerüst entfernt. Dadurch ist die Reaktion schon bei Raumtemperatur um einen Faktor zwei gegenüber dem Wildtyp beschleunigt. Im Sinne der hier diskutierten Theorie, kann die Entfernung der Wasserstoffbrückenbindung dem Chromophor P Zugang zu Positionen verschaffen, die einen deutlich größeren Überlapp mit dem Akzeptorchromophor B_A haben. Diese zusätzliche Bewegungsfreiheit, die das Special Pair dadurch gewinnt, wirkt sich auch auf die Entartung der C_l -Konformationen aus. Je mehr Zustände mit geringer Kopplung möglich sind, desto höher die Entartung. Dies bestätigt sich bei Betrachtung der angepaßten Parameter. Für die Mutante L168HF ergibt sich $n = 120$, während die Schwingungsfrequenz im Vergleich zum Wildtyp gleich bleibt.

Auch der dritte Elektronentransferschritt von P^+H^- nach P^+Q^- und die Rekombination von P^+Q^- in den Grundzustand von *Rb. sphaeroides* [Kuz98] konnten mit dieser Theorie erfolgreich angepaßt werden [Hup00].

Interessanterweise kann der gleiche Wert der Schwingungsfrequenz $\hbar\omega \sim 150 \text{ cm}^{-1}$ für alle Elektronentransferschritte verwendet werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß ähnliche Moden des Chromoproteins die verschiedenen Elektronentransferschritte bestimmen. Die dominante Oszillationsfrequenz, die in den hier vorgestellten Messungen in den Fourierspektren (siehe Abbildungen 5.7, 5.9, 5.12) zu sehen war, lag genau in diesem Bereich, bei $\hbar\omega = 145 \text{ cm}^{-1}$.

Während die langsameren Reaktionen mit einer relativ schwachen Temperaturabhängigkeit auch mit den konventionellen Methoden mit einem realistischen Parametersatz angepaßt werden konnten, gelang dies nicht für die schnellen Reaktionen, bei denen die Kopplung zwischen Donor und Akzeptor groß ist. Im Gegensatz dazu bietet hier die neu entwickelte Theorie ein erfolgreiches Mittel zur Anpassung und zum Verständnis temperaturabhängiger Elektronentransferreaktionen. Inwiefern diese Theorie auch auf andere Elektronentransfersysteme angewendet werden kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Kapitel 6

Femtosekundenspektroskopie an Bakteriorhodopsin

Die Messungen an BR wurden durchgeführt, um mit bestmöglicher zeitlicher Auflösung den ersten Schritt des Photozyklusses von BR, die Isomerisierung des Retinals genauer zu charakterisieren. Obwohl der Photozyklus in groben Zügen bereits bekannt scheint, besteht noch immer Aufklärungsbedarf, inwiefern bestimmte Schwingungsmoden des Retinals an die Reaktion koppeln, und wie die Potentialflächen, insbesondere die des angeregten Zustandes aussehen. In den Untersuchungen wurde das Retinal an verschiedenen spektralen Positionen mit extrem kurzen Anregungspulsen (ca. 20 fs) unterschiedlicher Wellenlänge (520 nm-615 nm) angeregt, und die transiente Absorptionsänderung bei Abtastwellenlängen zwischen 480 nm und 1000 nm mit höchster Zeitauflösung beobachtet.

6.1 Probenpräparation

Auch die BR-Proben wurden im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hergestellt (näheres zur Probenpräparation findet sich in [Oes74]). Zur pH-Wert-Stabilisierung wurde der Probe 10 mMolar Kaliumphosphatpuffer zugefügt. Die Probe wurde vor und während der Messung kontinuierlich mit einem Diaprojektor mit Licht zwischen 450 nm und 1000 nm bestrahlt, um möglichst alle Retinalmoleküle in den für den Photozyklus aktiven lichtadaptierten all-trans-Ausgangszustand zu bringen (siehe Kapitel 3). Dies konnte anhand der stationären Spektren überprüft werden: das Absorptionsmaximum von lichtadaptiertem BR liegt bei 568 nm, das Absorptionsmaximum von dunkeladaptiertem BR bei 558 nm (siehe Abbildung 6.1). Außerdem kann man anhand des stationären Spektrums erkennen, ob die Probe noch

intakt ist. Für die zeitaufgelösten Messungen wurde die Probe in einen neu ent-

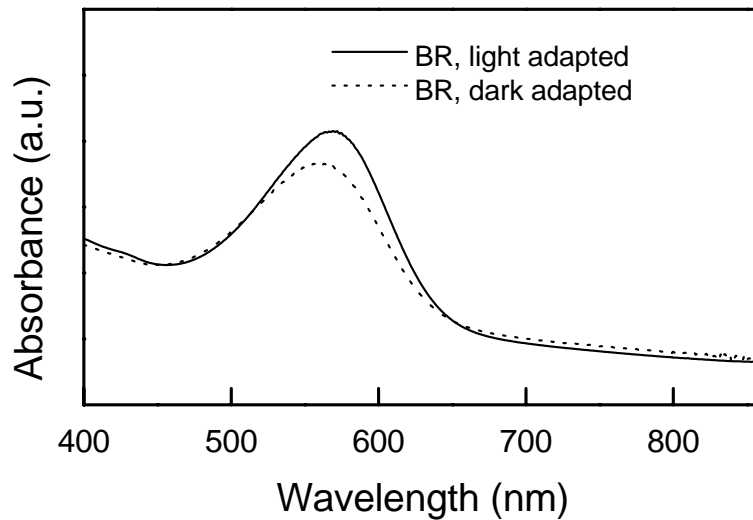


Abbildung 6.1: Spektren von lichtadaptiertem (durchgezogene Linie, Absorptionsmaximum bei $\lambda = 568$ nm) und dunkeladaptiertem (gestrichelte Linie, Absorptionsmaximum bei $\lambda = 558$ nm) BR.

wickelten Spritzenpumpstand mit einer $250 \mu\text{m}$ dicken Quarzglasküvette gefüllt. Die Durchpumpgeschwindigkeit der Spritzenpumpe war der Repetitionsrate des Systems (1 kHz) und der Küvettendicke flexibel angepaßt. Für einen Durchmesser des Anregungslichtbündels in der Probe von $< 100 \mu\text{m}$, einer Repetitionsrate von 1 kHz, einer Kanalbreite von ca. 1.5 mm und einer Schichtdicke von $250 \mu\text{m}$ mußte zu Vermeidung von Doppelanregungen der Probe eine Durchpumpgeschwindigkeit von etwa 7 ml/min verwendet werden. Die Intensität des Anregungsimpulses wurde so eingestellt, daß pro Einzelmessung höchstens 15% der Moleküle angeregt wurden. So konnte eine Anregung in höhere elektronische Zustände weitgehend ausgeschlossen werden.

Wie schon in Kapitel 4 erwähnt, wurde für die Messungen an BR die Kreuzkorrelationsbreite und der Zeitnullpunkt in einem BBO-Kristall (Dicke: $25 \mu\text{m}$) unabhängig bestimmt. Bei den Messungen im Bereich der langwelligen stimulierten Emission wurde besonderer Wert auf die Bestimmung des Zeitnullpunktes gelegt, um ein eventuell verzögertes Einsetzen des Meßsignals beobachten zu können. Die Anpassung der Meßdaten (durchgezogene Linie) erfolgte mit der unabhängig bestimmten Kreuzkorrelationsbreite.

6.2 Meßergebnisse

Abbildung 6.2 zeigt die Absorptionsspektren der Zustände BR, S_1 (excited-state-Absorption), J und K (aus [Pol86, Fra86, Dob87]) und das Spektrum der stimulierten Emission [Pol86].

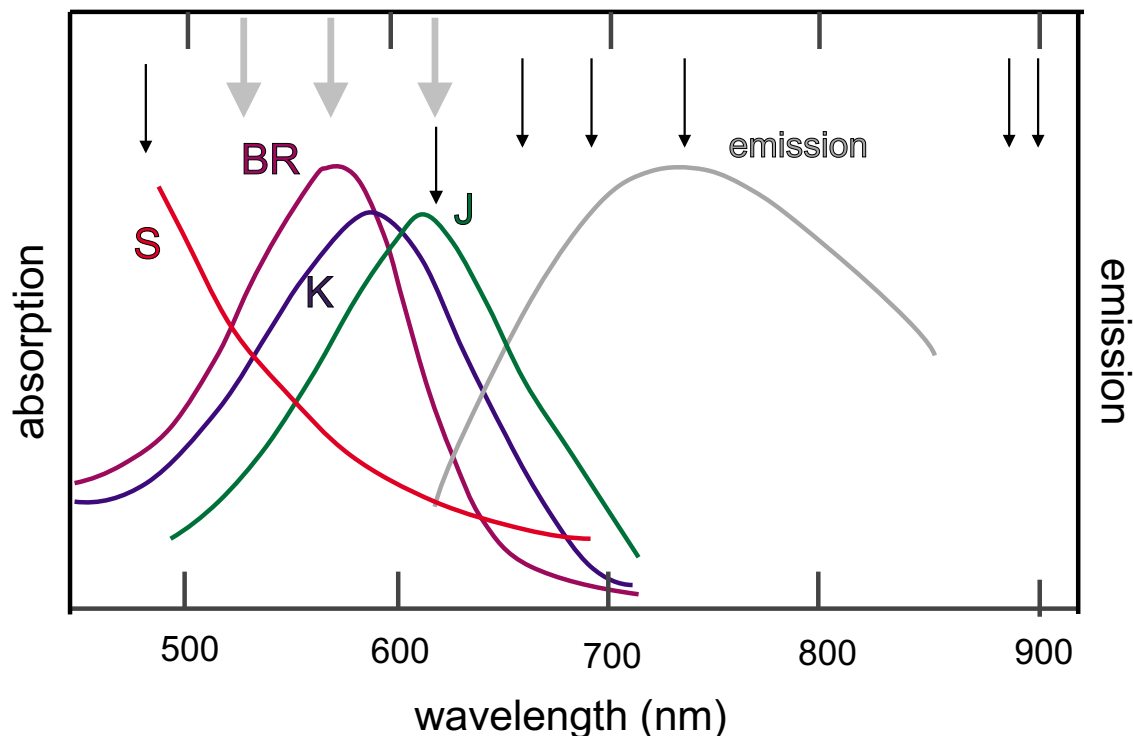


Abbildung 6.2: Absorptionsspektren der Zustände S_1 , BR, J und K und das Spektrum der stimulierten Emission aus [Dob87]. Die dicken grauen Pfeile kennzeichnen die verschiedenen Anregungswellenlängen bei $\lambda_{pu} = 530$ nm, $\lambda_{pu} = 570$ nm und $\lambda_{pu} = 615$ nm, die dünnen schwarzen Pfeile kennzeichnen die Abtastwellenlängen zwischen 480 nm und 900 nm.

Das Absorptionsspektrum des Zustandes J ist gegenüber dem Absorptionsspektrum des Grundzustandes BR rotverschoben (Absorptionsmaximum bei $\lambda = 610$ nm). Nach dem in Abbildung 3.4 vorgestellten Modell sollte das Retinal im Zustand J schon in isomerisierter Form vorliegen. Lange Zeit war unklar, ob der Zustand J noch elektronisch angeregt, oder schon ein Grundzustand ist. In den meisten aktuellen Modellen wird J als erstes Grundzustandsphotoprodukt diskutiert (siehe Kapitel 3). Das Photoprodukt K (Absorptionsmaximum bei 590 nm) wird aus dem Zustand J mit etwa 3.5 ps gebildet. K ist sicher ein elektronischer Grundzustand, da er bei

tiefen Temperaturen nicht mehr zerfällt. Im Zustand K liegt das Retinal in einer 13-cis Konfiguration vor, die Schiff'sche Base ist noch protoniert. Das Maximum der excited-state-Absorption (S) aus dem ersten angeregten Zustand von BR befindet sich bei etwa 460 nm, das Maximum der stimulierten Emission bei ca. 730 nm. Die für die Messungen wichtigen Wellenlängen sind in Abbildung 6.2 durch Pfeile gekennzeichnet:

Die Anregung (dicke Pfeile) erfolgte entweder im Maximum der Grundzustandsabsorptionsbande bei 570 nm, oder in der langwelligen (615 nm) oder kurzwelligen (530 nm) Flanke dieser Absorptionsbande. Um alle signifikanten Bereiche des Spektrums abzudecken, wurde die Abtastwellenlänge (einfache Pfeile) zwischen 480 nm und 1000 nm variiert. Dabei setzen sich die Beiträge zum Meßsignal bei den jeweiligen Wellenlängen wie folgt zusammen:

480 nm: Mit der Besetzung des ersten elektronisch angeregten Zustandes BR* oder S₁ erhält man eine Absorptionszunahme des Meßsignals, die dann entsprechend der Populationsabnahme des angeregten Zustandes abnimmt. Die Absorptionszunahme wird durch die Absorption des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes von BR (BR* oder S₁) in höher liegende elektronische Zustände erzeugt.

620 nm: Bei einer Wellenlänge von 620 nm absorbieren sowohl der Ausgangszustand BR, als auch die Photoprodukte J und K. Der Beitrag der kurzwelligen stimulierten Emission ist bei dieser Wellenlänge höchstens sehr klein. Man erwartet bei 620 nm ein sofortiges Ausbleichen des Grundzustandes mit der Anregung des Retinals, das anschließend entsprechend der Abnahme der Besetzung des angeregten Zustandes zerfällt. Gleichzeitig nimmt die Absorption zu, sobald die Photoprodukte J, bzw. K gebildet werden.

660 nm: Bei 660 nm absorbiert der Grundzustand BR praktisch nicht mehr, dafür liegt diese Abtastwellenlänge in der kurzwelligen Flanke der stimulierten Emission. Auch die Zustände J und K absorbieren bei 660 nm. In den Meßkurven sollte bei kurzen Verzögerungszeiten eine Absorptionsabnahme durch Einsetzen der kurzwelligen stimulierten Emission aus dem S₁-Zustand zu beobachten sein. Mit der Zeitkonstanten der Bildung des Photoproduktes J sollte eine Absorptionszunahme im Meßsignal zu beobachten sein. Da der Zustand K bei 660 nm weniger absorbiert als der Zustand J, sollte der Übergang zwischen J und K durch eine Absorptionsabnahme mit der Zeitkonstanten, die der Bildung des K-Zustandes entspricht, zu beobachten sein.

690 nm: Bei 690 nm bietet sich ein ähnliches Bild wie bei 660 nm, nur sollte hier der Beitrag der stimulierten Emission größer und die Absorptionszunahme kleiner

als bei 660 nm sein, da man sich nur noch am Rand der Absorptionsbande des J-Zustandes befindet. Der Zustand K absorbiert bei dieser Wellenlänge überhaupt nicht mehr.

730 nm: Bei 730 nm ist nur der Beitrag der kurzwelligen stimulierten Emission zu sehen. Man erwartet im Meßsignal eine sofort mit der Anregung auftretende Absorptionsabnahme. Diese Absorptionsabnahme nimmt proportional zur Besetzung der Franck-Condon-Region des S_1 -Zustandes ab, bis der Ausgangswert erreicht ist.

900 nm und 1000 nm: Hier kann eine Absorptionsabnahme als Folge des Einsetzens der langwelligen stimulierten Emission beobachtet werden. Die Absorptionsabnahme verschwindet mit der Entvölkerung des S_1 -Zustandes.

6.2.1 Vorbemerkungen

Die nächsten Abschnitte zeigen die Meßergebnisse in den oben angesprochenen Bereichen. Damit sowohl die hochfrequenten Oszillationen in der Nähe des Zeitnullpunktes als auch der Langzeitverlauf der Kurve dargestellt werden können, erfolgte die Auftragung der Daten bei allen Kurven bis 0.5 ps auf einer linearen, von 0.5 ps bis 10 ps auf einer logarithmischen Zeitskala.

Die Anpassung der Meßwerte folgte einem mehrexponentiellen Verlauf mit bis zu drei Zeitkonstanten. Zur Auswertung der Oszillationen wurde die angepaßte Modellkurve von den Meßwerten subtrahiert. Die so erhaltenen Residuen wurden fouriertransformiert. Die volle Amplitude einer Oszillation im Meßsignal ließe sich nur bei Abtastung mit δ -förmigen Impulsen beobachten. Da die in unseren Messungen verwendeten kurzen Pulse eine endliche Kreuzkorrelationsbreite haben, die in der gleichen Größenordnung wie die Frequenz der Oszillationen liegt, ist die Amplitude, die im Meßsignal zu beobachten ist, gedämpft. Der Zusammenhang zwischen voller Amplitude A_0 und gedämpfter Amplitude A_1 ergibt sich aus der Faltung eines Gaußpulses (Halbwertsbreite Δt) mit einer Sinusschwingung der Frequenz $\omega=2\pi/T$ zu:

$$\frac{A_1}{A_0} = \exp\left(-\frac{\pi^2}{4\ln 2} * \frac{\Delta t^2}{T^2}\right) \quad (6.1)$$

6.2.2 Messung bei 480 nm im Bereich der excited-state-Absorption

Die Messung bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm und einer Abtastwellenlänge von 480 nm zeigt die Absorption aus dem angeregten Zustand (siehe Abbildung 6.3). Die Meßkurve zeigt eine Absorptionszunahme, die innerhalb von 75 fs ihren Maxi-

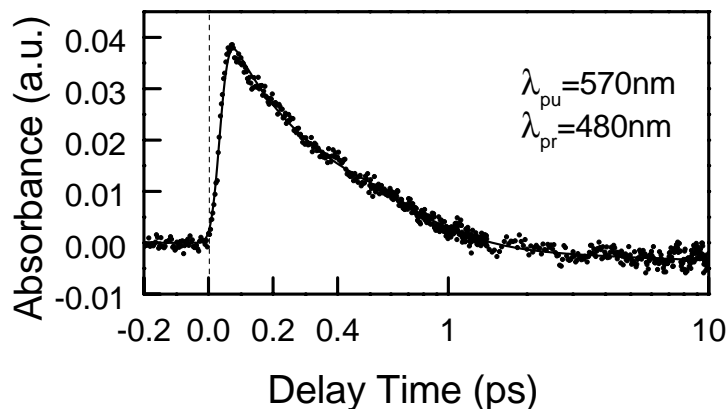


Abbildung 6.3: Messung bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{pu} = 570$ nm und der Abtastwellenlänge $\lambda_{pr} = 480$ nm. Die Anpassung der Meßpunkte erfolgte mit den Zeiten $\tau_1 = 200$ fs, $\tau_2 = 500$ fs, $\tau_3 = 3.5$ ps und $\tau_4 = \infty$.

malwert erreicht, und dann in erster Linie mit einer Zerfallszeit von 500 fs relaxiert (Tabelle 6.1 zeigt die Zeitkonstanten und die dazugehörigen Amplituden mit denen die Meßpunkte angepaßt wurden).

Abtastwellenlänge	$A(\tau_1 = 200 \text{ fs})$	$A(\tau_2 = 500 \text{ fs})$	$A(\tau_3 = 3.5 \text{ ps})$
480 nm	1	1.7	0.18

Tabelle 6.1: Auf $A(\tau_1)$ normierte Amplituden für die Anpassung der Meßdaten bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{pu} = 570$ nm und einer Abtastwellenlänge $\lambda_{pr} = 480$ nm.

Sowohl die Messung der Impulsdauer, als auch die Bestimmung des Zeitnullpunktes erwies sich bei dieser Wellenlängenkombination als äußerst schwierig, da zum einen die zur Verdopplung der Abtastfrequenz verwendeten Materialien in diesem Wellenlängenbereich lichtundurchlässig werden, zum anderen die Gruppengeschwindigkeitsdispersion in diesem Wellenlängenbereich schon bei kleinen Wegunterschieden eine beträchtliche Rolle spielt. Wegen dieser Problematik konnte der Zeitnullpunkt bei der Abtastwellenlänge $\lambda_{pr} = 480$ nm nicht ermittelt werden.

Aus dem Verlauf des Anstiegs des Meßsignals konnte in diesem schwierigen Wellenlängenbereich noch eine hohe Zeitaufösung mit einer Kreuzkorrelationsbreite von 55 fs erreicht werden. Somit konnte die 200 fs- und 500 fs-Kinetik beobachtet werden. Für die Oszillationen gilt folgendes: Eine höherfrequente Schwingung von 780 cm^{-1}

kann mit einer Kreuzkorrelationsbreite von 55 fs nicht mehr aufgelöst werden (Nach Gleichung 6.1 gilt $A_1/A_0 = 0.002$). Die niederfrequenterer Schwingung liegt mit einer Periode von ca. 166 fs zwar über der Kreuzkorrelationsbreite, jedoch ist die Amplitude der Oszillation bei der Messung mit einer Kreuzkorrelationsbreite von 55 fs nur 75 % der Amplitude bei Messungen mit einer Kreuzkorrelationsbreite von ca. 30 fs, wie sie im Wellenlängenbereich zwischen 620 nm und 730 nm verwendet werden konnte. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei einer Abtastwellenlänge von 480 nm nur niederfrequente Oszillationen mit schwacher Amplitude gefunden werden konnten. Das liegt zum einen an der etwas längeren Kreuzkorrelationsbreite, zum anderen am Wellenlängenbereich (in diesem Wellenlängenbereich absorbiert der Grundzustand nicht mehr, und die excited-state-Absorptionsbande ist sehr breit, weshalb sich Oszillationen nicht stark auswirken können).

6.2.3 Messungen im Bereich der Absorption der Intermediate J und K zwischen 620 und 730 nm

Die Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm, im Maximum der Grundzustandsabsorption von lichtadaptiertem BR und bei Abtastwellenlängen zwischen 620 nm und 730 nm sind in Abbildung 6.4 dargestellt. Alle Meßkurven zeigen bei kurzen Verzögerungszeiten eine instantane Absorptionsabnahme, die durch stimulierte Emission aus dem S_1 -Zustand von BR und/oder durch Ausbleichen des Grundzustandes von BR hervorgerufen wird [Har96]. Diese Absorptionsabnahme zerfällt biexponentiell mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 200$ fs und $\tau_2 = 500$ fs. Die so erreichte Absorptionszunahme läßt sich durch das Auftreten des Photoproduktes J erklären, dessen Absorptionsmaximum bei etwa 610 nm liegt. Je näher die Abtastwellenlänge am Absorptionsmaximum von J liegt, desto größer ist die Absorptionszunahme nach dem Verschwinden der stimulierten Emission zu Zeiten von ca. 1 ps. Der Übergang vom Zustand J nach K läßt sich als leichter Rückgang der Absorptionszunahme auf der 3-5 ps Zeitskala beobachten, da im betrachteten Spektralbereich J stärker als K absorbiert. Die zugehörige Übergangszeit von J nach K wurde mit einer Zeitkonstanten von 3.5 ps angepaßt.

Bei der Messung bei einer Abtastwellenlänge von 620 nm gelingt die Anpassung der Meßdaten nicht vollständig. Hier ist - wie anhand der Absorptions- und Emissionsspektren zu sehen ist - die Absorptionsabnahme am Zeitnullpunkt wesentlich auf das Ausbleichen des Grundzustandes zurückzuführen. Zusätzliche Absorptionseffekte, die mit dem Abkühlen eines heißen Moleküls verknüpft sind, könnten die

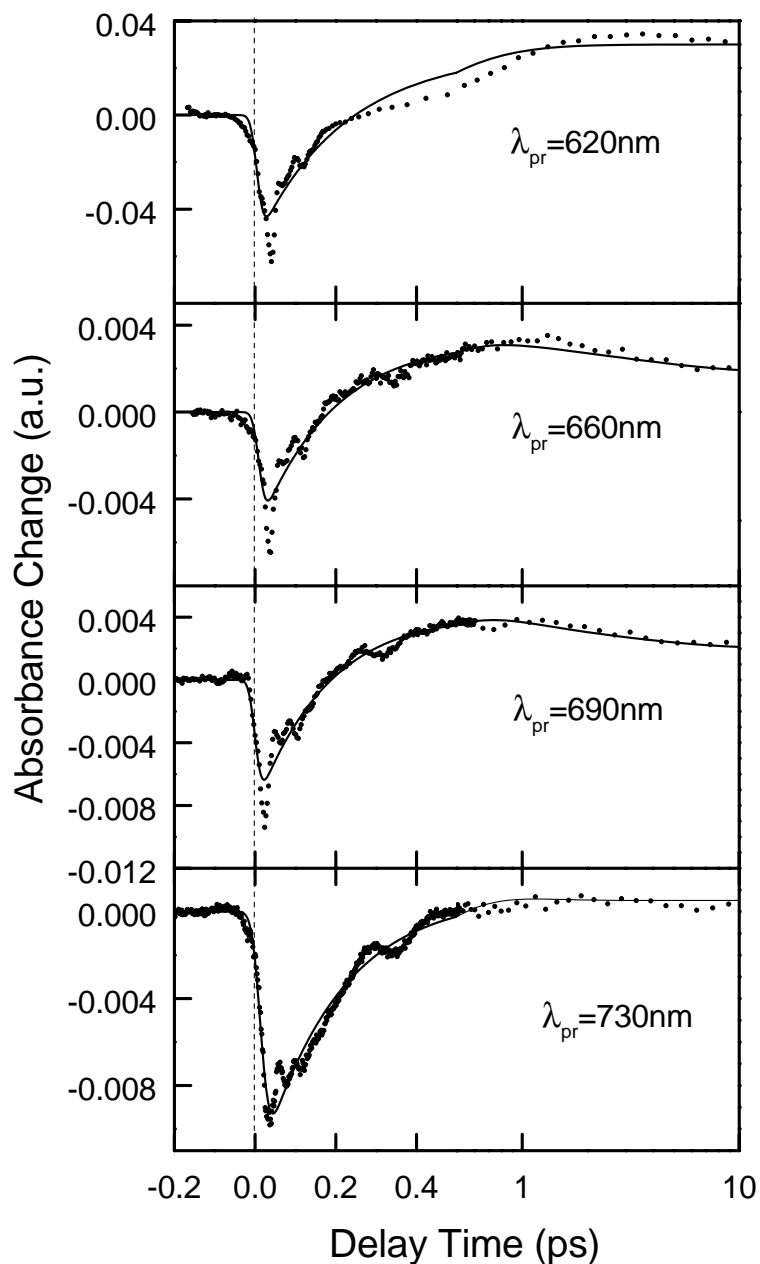


Abbildung 6.4: Messungen bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{pu} = 570$ nm und Abtastwellenlängen λ_{pr} zwischen 620 nm und 730 nm. Die Anpassung der Meßpunkte erfolgte für alle Kurven mit den Zeiten $\tau_1 = 200$ fs, $\tau_2 = 500$ fs, $\tau_3 = 3.5$ ps und $\tau_4 = \infty$. Die gestrichelte Linie oben links zeigt die Abnahme der Oszillationsamplitude in Abhängigkeit von der Frequenz nach Gleichung 6.1 bei Messungen mit einer Zeitaufösung von 35 fs.

Abweichungen von einem multiexponentiellen Verhalten verursachen. Die Amplitude der 200 fs-Komponente ist in der Datenanpassung etwa viermal stärker, als die

Amplitude der 500 fs-Komponente.

Bei den Messungen bei Abtastwellenlängen von 660 nm und 690 nm setzt sich das Meßsignal aus kurzweiliger stimulierter Emission und Absorption der Zustände J und K zusammen. Wie Tabelle 6.2 zeigt, sieht man in den Messungen bei 660 nm und 690 nm nur kleine Beiträge der 500 fs-Komponente. Sie können - ohne die Datenanpassung wesentlich zu verschlechtern - auch ohne die 500 fs-Zeit angepaßt werden. Erwartungsgemäß sieht man bei diesen beiden Wellenlängen im weiteren Verlauf der Meßkurve eine Absorptionsabnahme korreliert mit der 3.5 ps-Zeit, was dem Übergang von J nach K und der dazugehörenden Absorptionsabnahme entspricht.

Die Messung bei einer Abtastwellenlänge von 730 nm kann auch durch die Verwendung der 200 fs und der 500 fs-Zeit angepaßt werden. Die 3.5 ps-Komponente tritt in diesem Wellenlängenbereich nicht auf, da weder J noch K hier absorbieren. Da bei 730 nm das Meßsignal nur durch stimulierte Emission bestimmt wird, müssen diese beiden Zeiten mit dem ersten angeregten Zustand BR* korreliert sein.

Abtastwellenlänge	$A(\tau_1 = 200 \text{ fs})$	$ A(\tau_2 = 500 \text{ fs}) $	$A(\tau_3 = 3.5 \text{ ps})$
660 nm	-1	$< 0.1(A(\tau_1))$	0.15
690 nm	-1	$< 0.1(A(\tau_1))$	0.09
730 nm	-1	$< 0.1(A(\tau_1))$	0

Tabelle 6.2: Auf $A(\tau_1)$ normierte Amplituden für die Anpassung der Meßdaten bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{pu} = 570 \text{ nm}$ und Abtastwellenlängen λ_{pr} zwischen 620 nm und 730 nm.

Abtastwellenlänge	$A(\tau_1 = 200 \text{ fs})$	$A(\tau_2 = 500 \text{ fs})$	$A(\tau_3 = 3.5 \text{ ps})$
620 nm	-0.001	-1	0.12
660 nm	-1.04	-1	0.80
690 nm	-0.85	-1	0.63

Tabelle 6.3: Auf τ_2 normierte Amplituden für die Anpassung der Meßdaten bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{pu} = 530 \text{ nm}$ und Abtastwellenlängen λ_{pr} zwischen 615 nm und 730 nm.

Abbildung 6.5 zeigt im Vergleich dazu Messungen, die mit einer Anregungswellenlänge von 530 nm durchgeführt wurden. Der Verlauf der Meßkurven ähnelt im

Wesentlichen dem Verlauf der Meßkurven bei langwelligerer Anregung. Die Absorptionsabnahme erfolgt instantan am Zeitnullpunkt. Auch diese Messungen konnten mit den gleichen Zeiten ($\tau_1 = 200$ fs, $\tau_2 = 500$ fs und $\tau_3 = 3.5$ ps) angepaßt werden. In Tabelle 6.3 finden sich die dazugehörigen Amplituden, normiert auf die Amplitude der τ_2 -Zeit, da diese Zeit in diesem Meßbereich dominant ist. Vergleicht man die

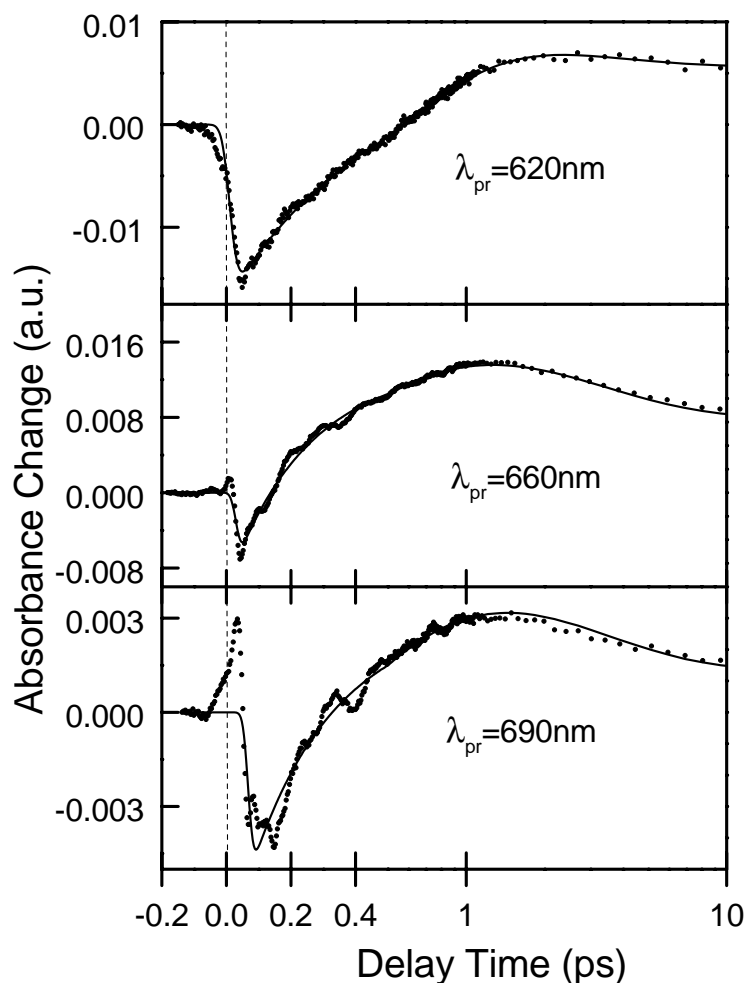


Abbildung 6.5: Messungen bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{pu} = 530$ nm und Abtastwellenlängen λ_{pr} zwischen 620 nm und 690 nm. Die Anpassung der Meßpunkte erfolgte für alle Kurven mit den Zeiten $\tau_1 = 200$ fs, $\tau_2 = 500$ fs, $\tau_3 = 3.5$ ps und $\tau_4 = \infty$.

Messungen mit einer Anregung bei 530 nm mit den Messungen bei 570 nm so fallen insbesondere folgende Unterschiede auf:

- Die Absorptionsabnahme bei $\lambda_{pr} = 620$ nm kurz nach dem Zeitnullpunkt zerfällt bei der höherenergetischen Anregung deutlich langsamer als bei der nieder-

energetischeren Anregung von 570 nm. Die 200 fs Komponente ist praktisch vernachlässigbar klein.

- Bei 660 nm und 690 nm fällt auf, daß oszillatorische Effekte und die Absorptionsabnahme am Zeitnullpunkt schwächer ausgeprägt sind, als bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 570 nm.
- Direkt am Zeitnullpunkt auftretende Absorptionsänderungen kommen zum Teil von nichtlinearen Prozessen wie dem „perturbed free induction decay effect“¹ oder kohärenter Kopplung [Dex92, Pol89, Cru88]. Im Experiment zeigt sich, daß dieser Effekt sehr eng mit der Geometrie des Meßaufbaus zusammenhängt. Da zwischen den Messungen bei $\lambda_{pu} = 570$ nm und $\lambda_{pu} = 530$ nm Umbauten am Meßplatz vorgenommen werden mußten, können die Effekte am Zeitnullpunkt damit erklärt werden. Die beobachteten Unterschiede sollen deshalb nicht mit molekularen Vorgängen in Zusammenhang gebracht werden.

Oszillatorisches Verhalten im Bereich zwischen 620 nm und 730 nm

Alle in diesem Spektralbereich aufgenommenen Meßkurven zeigen in der ersten Pikosekunde nach dem Zeitnullpunkt Oszillationen. Um diese Modulationen, die dem mehr exponentiellen Zerfall überlagert sind, auswerten zu können, wurde die mit den Zeiten $\tau_1 = 200$ fs, $\tau_2 = 500$ fs und $\tau_3 = 3.5$ ps angepaßte Modellkurve von den Meßwerten subtrahiert. Die Fouriertransformationen dieser so erhaltenen Residuen geben Informationen über beteiligte Schwingungsfrequenzen. Die Intensitäten der Fourierspektren sind in Abbildung 6.6 zu sehen. Obwohl gerade bei den Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 570 nm die Oszillationen in den Meßkurven deutlich zu sehen sind, zeigen die Fouriertransformationen breite Spektren. Dies beruht darauf, daß die Oszillationen auch auf Grund der kurzen S_1 Lebensdauer stark gedämpft sind, und gerade bei der niederfrequenten Schwingung nur eine Periode sichtbar ist. Deshalb ist es schwierig die Frequenzen genau zu bestimmen. Außerdem beeinflussen die Modulationen, die dem multiexponentiellen Zerfall überlagert sind, auch die Anpassung der Meßdaten. In Tabelle 6.4 sind die Frequenzen, die in den Fourierspektren zu erkennen sind, zusammengefaßt. Andere Möglichkeiten zur

¹Der Abtastimpuls erzeugt in der Probe eine kohärente Polarisation, die mit einer gewissen Relaxationszeit zerfällt. Diese Polarisation strahlt Licht ab, welches auf den Abtastdetektor gelangt. Kommt der Anregungspuls zeitlich nach dem Abtastimpuls (negative Verzögerungszeiten), so kann er zwar nicht die Intensität des Abtastimpulses, wohl aber die der zerfallenden freien Polarisation beeinflussen. Dies bewirkt eine Änderung des Signals am Abtastphotodetektor vor dem Zeitnullpunkt [Ham95].

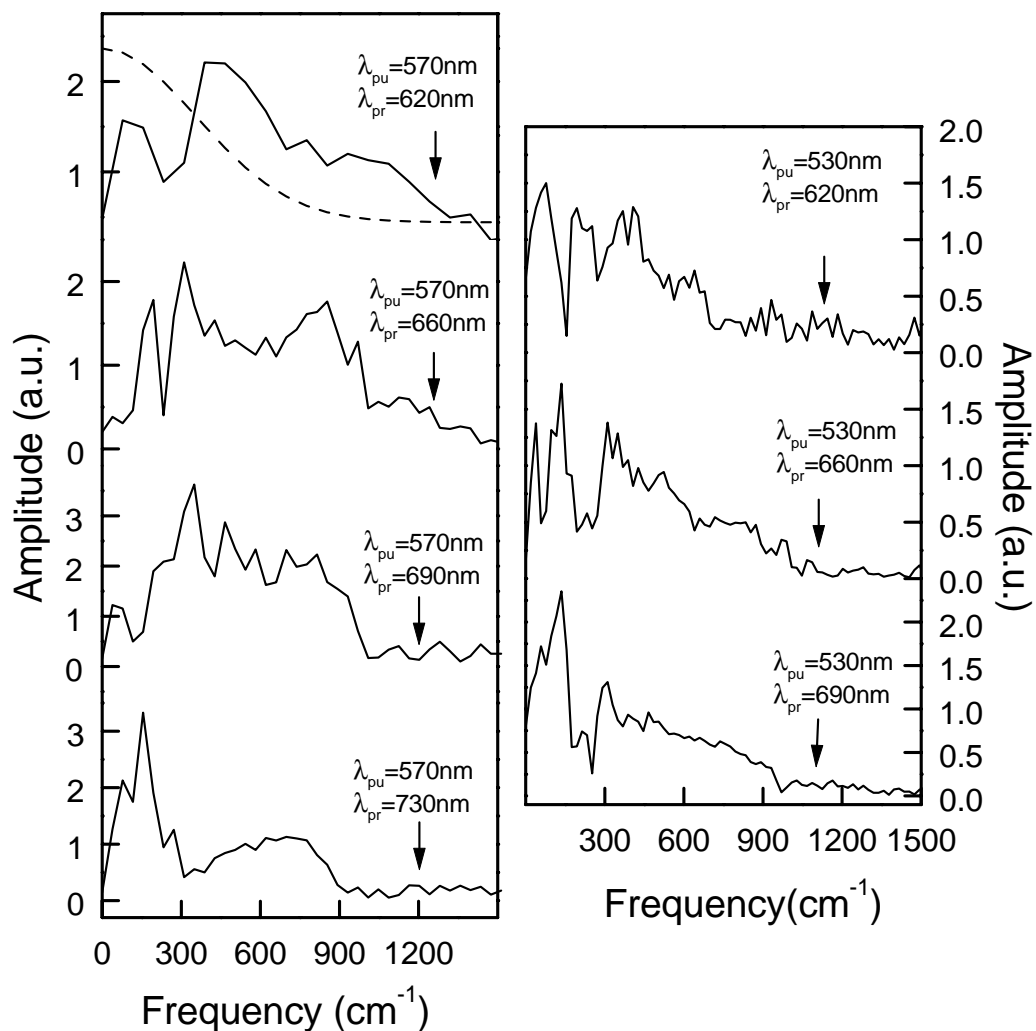


Abbildung 6.6: Fouriertransformationen der Residuen für die Messungen bei $\lambda_{pu} = 570$ nm (links), und $\lambda_{pu} = 530$ nm (rechts). Die Pfeile kennzeichnen die Kreuzkorrelationsbreite, mit der die Meßkurve aufgenommen wurde. Sie sind ein Maß für die Frequenz, die bei der jeweiligen Wellenlänge maximal aufgelöst werden kann. Im Fourierspektrum links oben ($\lambda_{pu} = 570$ nm, $\lambda_{pr} = 620$ nm) ist die Abnahme der Amplitude als Funktion der Oszillationsfrequenz beispielhaft für eine Halbwertsbreite des Gaußpulses von 35 fs eingezeichnet (nach Gleichung 6.1).

Bestimmung der Frequenzen bestehen darin, die Abstände zwischen zwei Maxima oder Minima der Oszillationen direkt auszumessen, oder eine gedämpfte Sinusfunktion zur Datenanpassung hinzuzunehmen. Mit den beschriebenen Methoden erhält man im Wesentlichen zwei Frequenzen: $\omega_1 = 780 \pm 50$ cm^{-1} und $\omega_2 = 200 \pm 40$ cm^{-1} .

Anregungswellenlänge	Abtastwellenlänge	ω_1 (cm ⁻¹)	ω_2 (cm ⁻¹)	ω_3 (cm ⁻¹)
570 nm	620 nm	150	400	900
570 nm	660 nm	200	300	850
570 nm	690 nm	-	350	800
570 nm	730 nm	150	-	700
530 nm	620 nm	200	400	650
530 nm	660 nm	150	300	800
530 nm	690 nm	140	300	750

Tabelle 6.4: Aus den Fourierspektren erhaltene Frequenzmaxima der Messungen bei Anregungswellenlängen $\lambda_{pu} = 570$ nm und $\lambda_{pu} = 530$ nm und Abtastwellenlängen zwischen $\lambda_{pr} = 620$ nm und $\lambda_{pr} = 730$ nm.

6.2.4 Messungen im Bereich der reinen stimulierten Emission

Bei Abtastwellenlängen zwischen 890 nm und 1000 nm absorbieren weder der Grundzustand noch die Photoprodukte J und K. Hier kann also die reine stimulierte Emission aus dem angeregten elektronischen S₁-Zustandes beobachtet werden. Abbildung 6.7 zeigt Messungen mit einer Zeitauflösung von 40 fs bei einer Abtastwellenlänge von 890 nm und bei Anregungswellenlängen zwischen 530 nm und 615 nm. Der Verlauf der Meßdaten ist in diesem Bereich praktisch monoexponentiell mit einer Zerfallszeit von 500 fs. Die Besetzung des angeregten Zustandes von BR nimmt also in erster Linie mit einer Zeitkonstanten von 0.5 ps ab (der Anteil einer 200 fs-Komponente ist kleiner als 5%). Nach dem in Kapitel 3 vorgestellten eindimensionalen Modell (Abbildung 3.5) müßte die langwellige stimulierte Emission verzögert einsetzen, da das im angeregten Zustand erzeugte Wellenpaket erst zum Potentialminimum gelangen muß. Um diese Verzögerung bestimmen zu können, wurde in diesem Wellenlängenbereich besonderer Wert auf die genaue Bestimmung des Zeitnullpunktes gelegt. Dazu wurde wie oben erwähnt, die Kreuzkorrelation, und damit der Zeitnullpunkt extern in einem 25 μ m-BBO-Kristall gemessen. Bei der Anpassung der Meßdaten wurde der Zeitnullpunkt nochmals variiert. Die Differenz zwischen dem im BBO bestimmten Zeitnullpunkt und dem durch die Anpassung bestimmten Zeitnullpunkt ergibt die Verzögerung des Einsetzens der stimulierten Emission. Wie man in der Abbildung 6.7 erkennen kann, ist eine Verzögerung des Signals bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm zu beobachten, d.h. die beste Anpassung erhält man bei Verschiebung des Nullpunktes um 40 fs. Bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm setzt die sti-

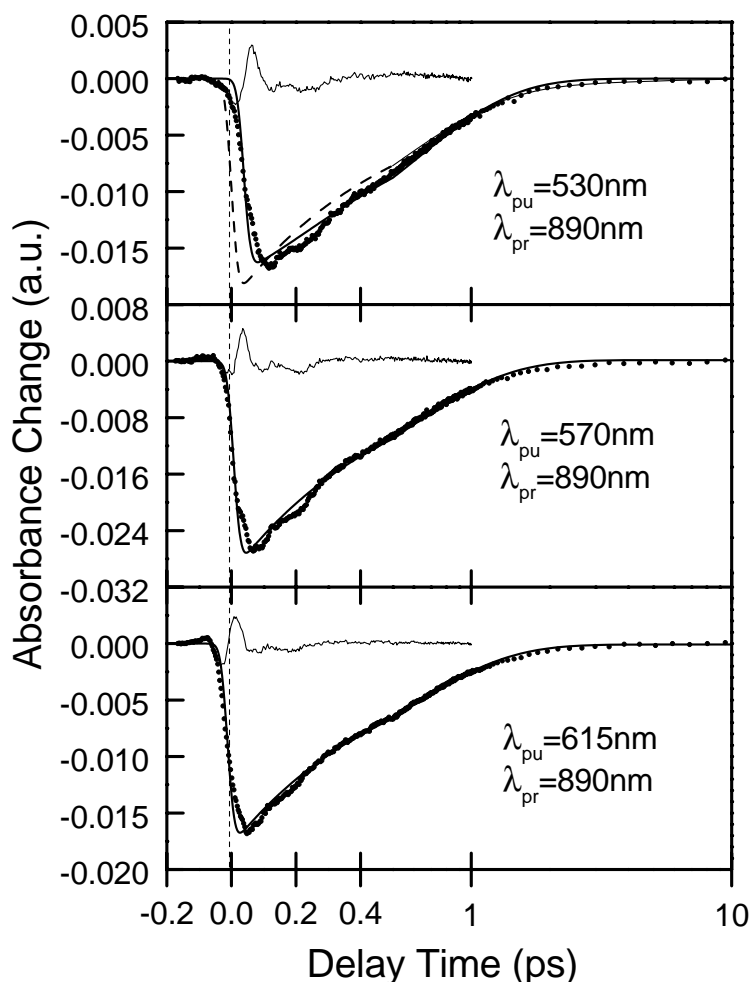


Abbildung 6.7: Messungen bei Anregungswellenlängen λ_{pu} zwischen 530 nm und 615 nm und einer Abtastwellenlänge $\lambda_{pr} = 890\text{ nm}$. Die Anpassung der Meßpunkte erfolgte für alle Kurven mit den Zeiten $\tau_2 = 500\text{ fs}$ und $\tau_4 = \infty$. Da der Zeitnullpunkt bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm (oben) signifikant verschoben ist, ist gestrichelt die beste Datenanpassung mit unverschobenem Zeitnullpunkt eingezeichnet.

mulierte Emission sofort ein, bei 615 nm scheint das Signal schon 12 fs vor dem Zeitnullpunkt aufzutreten². Je höherenergetisch die Anregung ist, desto später setzt die stimulierte Emission ein. Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 570 nm und einer Abtastwellenlänge von 900 nm mit einer Zeitaufösung von ca. 50 fs (siehe Abbildung 6.8) bestätigen dies. Bei einer Abtastwellenlänge von 900 nm, wie schon bei 890 nm beobachtet man instantanes Einsetzen der stimulierten Emission. Bei

²Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß der Fehler bei der Zeitnullpunktsbestimmung etwa 10 fs beträgt, da Ungenauigkeiten bei der Fensterdicke der Probe bzw. des Kristalls und kleine Verschiebungen der Verzögerungsstrecke des Schrittmotors nicht zu vermeiden waren.

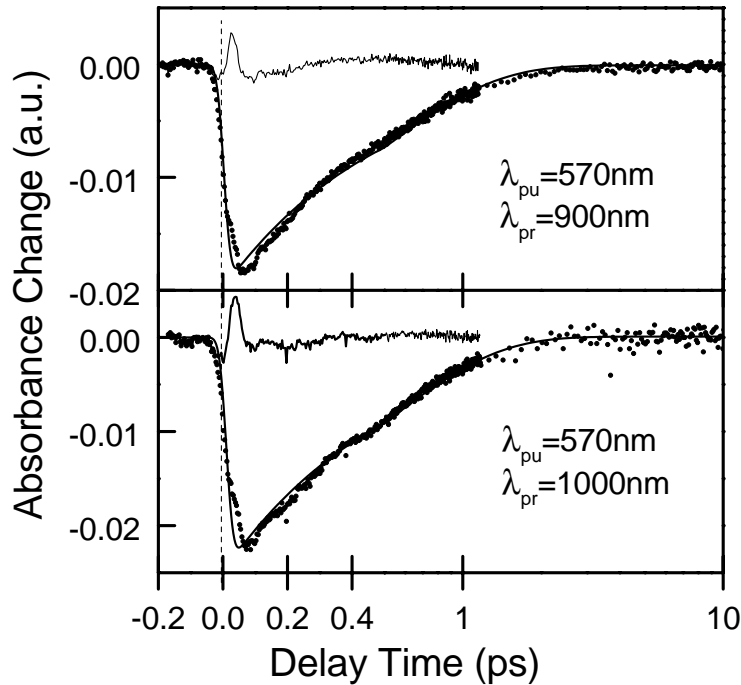


Abbildung 6.8: Messungen bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{pu} = 570$ nm und Abtastwellenlängen $\lambda_{pr} = 900$ nm und 1000 nm. Die Anpassung der Meßpunkte erfolgte für alle Kurven mit den Zeiten $\tau_2 = 500$ fs und $\tau_4 = \infty$.

der Abtastwellenlänge $\lambda_{pr} = 1000$ nm ist der Zeitnullpunkt um ca. 10 fs verschoben. Dies bedeutet, daß nicht nur höherenergetische Anregung, sondern auch langwelligeres Abtasten zu einem verzögerten Einsetzen der stimulierten Emission führen. Bei einer genauen Betrachtung des Signalanstieges bei allen Kurven in diesem Wellenlängenbereich beobachtet man, daß nur etwa 80 % der stimulierten Emission mit der Zeit der Kreuzkorrelationsbreite gebildet werden. Danach knickt die Meßkurve leicht ab, das Maximum der stimulierten Emission wird erst nach ca. 55 fs erreicht. Gerade in diesem frühen Bereich sind auch die Oszillationen, die auf eine Wellenpaketsbewegung im angeregten Zustand hinweisen, besonders prägnant. Dies legt die Vermutung nahe, daß eine Oszillation mit einer Periode von ca. 40 fs³ für das Abknicken im Anstieg des Meßsignals verantwortlich sein könnte. Abbildung 6.9 zeigt die Fouriertransformierten der Residuen, Tabelle 6.5 die Banden, die in den Fourierpektren zu sehen sind. Bei allen Wellenlängen sieht man ein breites Maximum

³In den Messungen mit höchster Zeitauflösung bei Abtastwellenlängen zwischen 620 nm und 730 nm wurde eine Frequenz von ca. 780 cm^{-1} gefunden.

bei ca. 300 cm^{-1} . Die bei Abtastwellenlängen im sichtbaren Spektralbereich beobachtete Frequenz bei ca. 780 cm^{-1} konnte offensichtlich aufgrund der schlechteren Zeitauflösung von 40 fs hier nicht beobachtet werden.

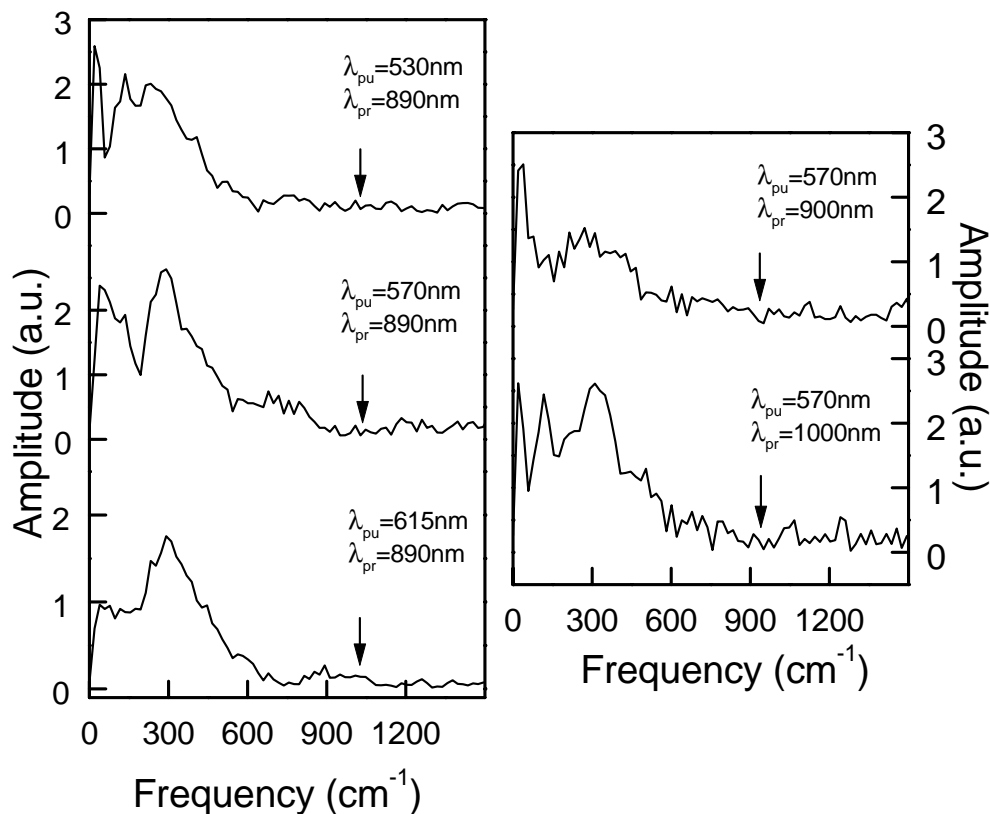


Abbildung 6.9: Fouriertransformationen der Residuen für die Messungen bei $\lambda_{pr} = 890 \text{ nm}$ (links), und $\lambda_{pr} = 900 \text{ nm}$, bzw. 1000 nm (rechts). Die Pfeile kennzeichnen die Kreuzkorrelationsbreite, mit der die Meßkurve aufgenommen wurde und sind so ein Maß für die Auflösbarkeitsgrenze der Oszillationsfrequenzen.

Anregungswellenlänge	Abtastwellenlänge	$\omega_1 (\text{cm}^{-1})$	$\omega_2 (\text{cm}^{-1})$	$\omega_3 (\text{cm}^{-1})$
530 nm	890 nm	-	230	520
570 nm	890 nm	-	300	680
615 nm	890 nm	100	300	600
570 nm	900 nm	-	300	450
570 nm	1000 nm	100	300	500

Tabelle 6.5: Aus den Fourierspektren erhaltene Frequenzmaxima der Messungen bei Anregungswellenlängen zwischen $\lambda_{pu} = 530 \text{ nm}$ und $\lambda_{pu} = 615 \text{ nm}$ und Abtastwellenlängen zwischen $\lambda_{pr} = 890 \text{ nm}$ und $\lambda_{pr} = 1000 \text{ nm}$.

6.3 Diskussion

Alle Messungen bei Anregungswellenlängen zwischen 530 nm und 620 nm und Abtastwellenlängen zwischen 480 nm und 1000 nm konnten mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 200$ fs, $\tau_2 = 500$ fs und $\tau_3 = 3.5$ ps angepaßt werden. Im Bereich der reinen stimulierten Emission bei Abtastwellenlängen ab 890 nm konnte außerdem erstmalig festgestellt werden, daß der Anstieg der stimulierten Emission zu 80 % instantan eintritt (≤ 10 fs), ein kleiner Prozentsatz (ca. 20 %) erfolgt leicht verzögert, was in einem leichten Abknicken der Meßkurve nach dem sofortigen Anstieg zu sehen ist. Sowohl im Bereich der stimulierten Emission, als auch im Bereich der Grundzustands- und der Photoproduktzustansabsorption konnten Oszillationen zwischen 100 cm^{-1} und 800 cm^{-1} beobachtet werden. Außerdem wurde vor allem im Bereich der stimulierten Emission die Anregungswellenlänge variiert, um den Einfluß der Anregungsenergie auf die Reaktionen zu untersuchen.

6.3.1 Reaktionsmodelle

Laut den in Kapitel 3 Abbildungen 3.5 und 3.8 vorgestellten Modellen, müßte die Anregung von BR in einen relativ steil abfallende Bereich der S_1 -Potentialfläche erfolgen. Die erste Bewegung des Wellenpakets von der Franck-Condon-Region in das Potentialminimum müßte zu einer Rotverschiebung der stimulierten Emission führen, korreliert mit der Zeitkonstanten der ersten Bewegung des Retinals im angeregten Zustand (ca. 200 fs). Die langwellige stimulierte Emission, die aus dem Potentialminimum der S_1 -Potentialfläche stattfindet, sollte demnach um ca. 200 fs zum Anregungsimpuls verzögert auftreten. Die hier vorgestellten Messungen, sowie Messungen anderer Gruppen mit zum Teil schlechterer Zeitauflösung konnten ein dermaßen verzögertes Einsetzen der stimulierten Emission nicht beobachten [Has96, Du93]. Auch das Zweizustandsmodell (Abbildung 3.6) kann das Auftreten der 200 fs-Komponente im sichtbaren Abtastbereich und das sofortige Auftreten der langwelligen stimulierten Emission nicht erklären. In diesem Modell befindet sich im angeregten Zustand eine Potentialbarriere. Die Zeit, in der sich das Retinal im angeregten Zustand befindet, ist in diesem Modell durch die Zeit definiert, die es benötigt, die Potentialbarriere zu überqueren. Die langwellige stimulierte Emission sollte aus dem flachen Teil der S_1 -Potentialfläche erfolgen. Sie tritt bei Abtastwellenlängen $\lambda_{pr} \geq 890$ nm auf. Dies entspricht einem ca. 7000 cm^{-1} kleineren Abstand zwischen den Potentialflächen als bei $\lambda_{pu} = 570$ nm, wo die Anregung vom Potentialminimum der Grundzustandspotentialfläche in die Franck-Condon-Region der

S_1 -Potentialfläche stattfindet. Die 200 fs Reaktion läßt sich also nicht in diesem Modell erklären.

Die Beobachtung einer 200 fs-Komponente im sichtbaren Abtastwellenlängenbereich und das schnelle Auftreten der langwelligen stimulierten Emission muß daher in einem erweiterten Modell interpretiert werden:

Das in der Franck-Condon-Region der S_1 -Potentialfläche präparierte Wellenpaket bewegt sich auf dieser Potentialfläche längs der Koordinate einer hochfrequenten Mode (z.B. der C-C-Streckschwingung) zum Potentialtal und zerläuft dabei mit einer Dissipationszeit $\tau_1 = 200$ fs. Von dem flachen Potentialminimum findet der Übergang auf die Grundzustandsfläche mit einer Zeit $\tau_2 = 500$ fs statt (s.u.), von dort relaxiert es entweder zurück in den Ausgangszustand (all-trans) oder in das Photoprodukt J (13-cis). In diesem Bild ist die τ_1 -Zeit also nicht nur mit einer Wellenpaketsbewegung, sondern auch mit einer Relaxation verknüpft. Die starke Dämpfung der Oszillationen, die im Experiment beobachtet werden konnte, bestätigt diese Interpretation. Regt man das Retinal mit einem höherfrequenten Anregungsimpuls an ($\lambda_{pu} = 530$ nm), so liegen die Schwingungsniveaus weiter im anharmonischen Bereich. Es können also leichter verschiedene Wellenpakete mit einem breiten Spektrum von Schwingungsfrequenzen präpariert werden, die - wegen ihrer schnellen Dephasierung - sehr bald keine phasenrichtige Überlagerung mehr erlauben. Deswegen sind hier die Maxima der Oszillationen nicht mehr so gut zu beobachten und die 200 fs-Komponente ist deutlich schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 6.5 und Tabelle 6.3).

Unter der Voraussetzung, daß die 200 fs-Komponente die Zeit widerspiegelt, die das Wellenpaket benötigt, um von der Franck-Condon-Region zum Potentialtal zu gelangen, läßt sich der Reaktionsablauf wie in in Abbildung 6.10 gezeigt, vorstellen. Hierbei werden zwei Möglichkeiten für die Erklärung der instantan einsetzenden langwelligen stimulierten Emission vorgestellt.

(1) Falls ein zusätzlicher Zustand zwischen der S_1 - und der S_0 -Potentialfläche existiert, der energetisch etwa 11000 cm^{-1} (entspricht 900 nm) unter dem S_1 -Zustand liegt, könnte die langwellige stimulierte Emission in diesen Zustand X sofort auftreten. Zusätzlich könnte bei Abtastwellenlängen im sichtbaren Spektralbereich die kurzwellige Emission in den S_0 -Zustand beobachtet werden. Allerdings konnte bisher noch kein zusätzlicher Zustand in diesem Spektralbereich gefunden werden. Ein Kandidat für einen solchen Zustand wäre der tiefste Triplettzustand T_1 , der bei einem verzerrten Retinal Oszillatorstärke gewinnen könnte. Eine andere Möglichkeit, einen Übergang zum T_1 zu sehen, wäre eine Einmischung von Triplettcharakter in

den verzerrten S_1 -Zustand [Tav00].

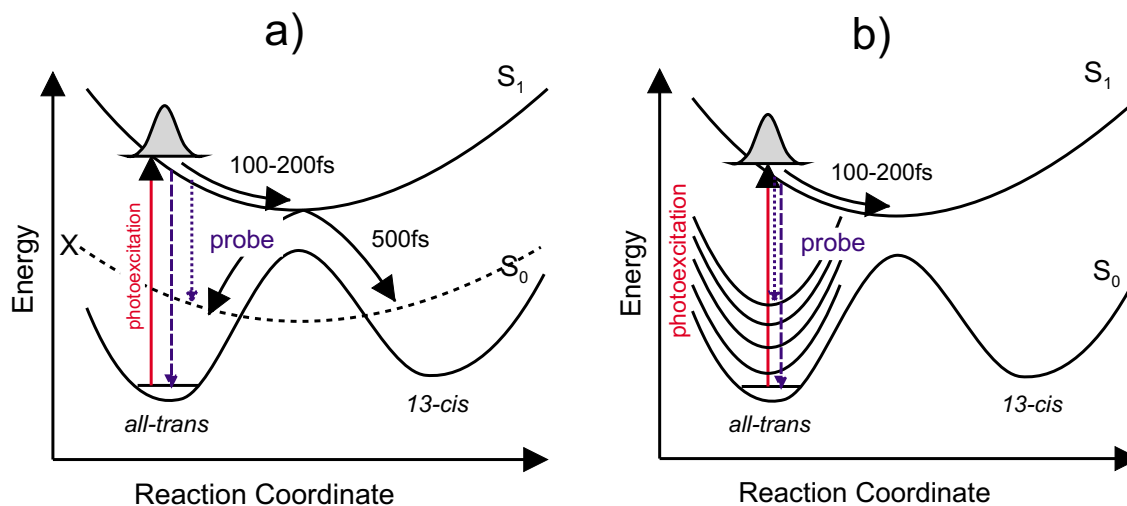


Abbildung 6.10: Erweiterung des eindimensionalen Modells:a) die langwellige stimulierte Emission (gepunktete Linie) findet vom S_1 -Zustand in den Zustand X statt, die kurzwellige stimulierte Emission (gestrichelte Linie) von S_1 nach S_0 ; b) Übergang zu Obertönen und hochfrequenten Schwingungen im Grundzustand durch langwellige stimulierte Emission.

(2) Eine andere Erklärung für eine schnell auftretende langwellige stimulierte Emission wären Übergänge zu Obertönen und Kombinationen von hochfrequenten Schwingungen im Grundzustand S_0 , die durch die beginnende Verzerrung des Retinals und eine erste Wellenpaketsbewegung Oszillatorstärke gewinnen könnten (siehe Abbildung 6.10,b)).

6.3.2 Wellenpaketsbewegungen und Isomerisation

Die Modulationen des Meßsignals weisen mehrere Frequenzen auf: im Abtastbereich zwischen 620 nm und 730 nm lassen sich im Wesentlichen drei Schwingungsfrequenzen auflösen. Eine niederfrequente Schwingung bei etwa 150 cm^{-1} , eine Schwingung zwischen 300 cm^{-1} und 400 cm^{-1} und eine höherfrequente Schwingung zwischen 650 cm^{-1} und 900 cm^{-1} . Im Bereich der langwelligen stimulierten Emission ist eine Frequenz von ca. 300 cm^{-1} dominant. Eine höherfrequente Bande zwischen 450 cm^{-1} und 680 cm^{-1} und eine niederfrequenterer Bande bei etwa 100 cm^{-1} sind in einigen Fourierpektren als Nebenmaxima zu erkennen. Interpretiert man das Abknicken des Signalanstiegs in den Messungen im Bereich der langwelligen stimulierten Emission

als schwache Oszillation, so erhält man dafür eine Frequenz von etwa 830 cm^{-1} . Wie oben erwähnt, konnte eine Frequenz in dieser Größenordnung bei den Messungen im sichtbaren Spektralbereich aufgelöst werden.

Für eine Unterscheidung, welche Schwingungen an die Isomerisation koppeln, ist es wichtig, zu wissen, ob die Schwingung nur im angeregten Zustand vorliegt oder auch im Grundzustand. Die Oszillationen, die zwischen 730 nm und 1000 nm beobachtet werden konnten, müssen mit Wellenpaketsbewegungen im S_1 -Zustand korreliert sein, da in diesem Wellenlängenbereich weder der Grundzustand, noch ein Photoprodukt absorbieren. Ramanmessungen im angeregten Zustand von BR deuteten an, daß die HOOP-Schwingung (HOOP: hydrogen out of plane) bei einer Frequenz von 800 cm^{-1} im angeregten Zustand nicht vorhanden ist. Das Fehlen dieser Bande kann im Wesentlichen folgende Gründe haben:

- a) Die Photoisomerisation geschieht erst kurz bevor das Wellenpaket die S_1 -Potentialfläche durch die konische Durchschneidung verläßt.
- b) Die Photoisomerisation geschieht nicht im angeregten Zustand, sondern in einem heißen Grundzustand [Son98].

Eine niederfrequenter Schwingung bei 150 cm^{-1} konnte auch bei Messungen an BR und einem BR-Analog mit blockierter $C_{13}=C_{14}$ -Bindungsstelle gefunden werden [Ye99b]. Die von ihnen beobachtete Frequenz von ca. 150 cm^{-1} ordnen sie einer Skelettbewegung zu, wahrscheinlich schwingen ganze Gruppen des Retinals gegeneinander. Die Messungen an den blockierten Retinalen zeigen jedoch, daß diese Schwingung nicht direkt mit der Isomerisationszeit verknüpft sein kann.

Eine Mode von ca. 245 cm^{-1} wurde in den theoretischen Rechnungen von Stock et al. für Rhodopsin vorhergesagt: sie fanden die Fundamente für die Bewegung längs der Reaktionskoordinate bei einem Stokes-Shift von 245 cm^{-1} [Hah99]. Doch auch in diesen Berechnungen konnte nichts über die genaue Bedeutung dieser Schwingung gesagt werden.

Femtosekundenmessungen an BR mit bandbreitebegrenzten, positiv und negativ gechirpten Pulsen konnten zeigen, daß die Schwingungsbande im Bereich von 250 cm^{-1} konstant bleibt [Bar98]. Dies deutet darauf hin, daß diese Bande nicht an die Isomerisation koppelt. Mit der gleichen Meßtechnik konnte ein starkes Anwachsen der Schwingungsbande bei 1570 cm^{-1} im Falle transformlimitierter Anregungsimpulse im Vergleich zu sowohl positiv als auch negativ gechirpter Impulse festgestellt werden, was als Zusammenhang dieser Schwingung, (die als C=C-Streckschwingung bekannt ist [Mye83, Mye87]), mit der Isomerisationsbewegung

interpretiert wurde. Da die transformlimitierten Impulse kürzer als positiv oder negativ gechirpte Impulse sind, ist es allerdings nur normal, daß die Amplitude der hochfrequenten C=C-Streckschwingung bei transformlimitierten Impulsen am ausgeprägtesten ist ⁴. Auch die Resonanzramanmessungen von Song et al. [Son98] bestätigen zeitabhängige Änderungen in den C=C-Bindungen während der von ihnen benutzten 1 ps-langen Laserpulse. Diese hochfrequenten C=C-Streckschwingungen konnten bei der hier vorliegenden Arbeit nicht aufgelöst werden, da die Kreuzkorrelationsbreite mit ca. 30-40 fs zu lang war.

Zusammenfassend kann für die schnelle Isomerisierung und die daran beteiligten Wellenpaketsbewegung auf dem relevanten Teil der angeregten Potentialfläche von BR folgendes Bild erstellt werden (siehe Abbildung 6.11): Nach Anregung in die Franck-Condon-Region des angeregten S₁-Zustandes mithilfe eines ultrakurzen Laserpulses wird ein Wellenpaket präpariert, welches sich sowohl verbreitert, als auch in ein Potentialtal des S₁-Zustandes relaxiert. Diese Bewegung erfolgt entlang von Kopplungsmoden. Im Fall von BR ist eine dieser Moden, die durch die Anregung ausgelentet wird, die C=C-Streckschwingung mit 1570 cm⁻¹, jedoch sind auch niederfrequenteren Moden beteiligt. Hinweise auf die Beteiligung der C=C-Streckschwingung am Isomerisationsprozeß finden sich in den Resonanzramanmessungen [Son98] und in den Femtosekundenexperimenten von Bardeen et al. [Bar98]. Von der Franck-Condon-Region relaxiert das Wellenpaket in das Potentialtal SP. Diese Relaxation ist mit der 200 fs-Komponente verknüpft. Ein experimenteller Hinweis darauf findet sich in den Anregungswellenlängen abhängigen Messungen: in den Messungen mit höherenergetischer Anregung bei Abtastwellenlängen zwischen 620 nm und 690 nm war die 200 fs-Komponente im Vergleich zur 500 fs-Komponente schwächer ausgeprägt. Ein insgesamt also langsamerer Zerfall der ursprünglichen Absorptionsänderung kann bedeuten, daß das Wellenpaket länger braucht, um zum Potentialtal zu gelangen. Auch das verzögerte Einsetzen der langwelligen stimulierten Emission bei hochfrequenter Anregung und das sofortige Eintreten bei niederfrequenter Anregung läßt sich in diesem Bild erklären: bei Anregung im langwelligen Maximum der Grundzustandsabsorptionsbande hat das Wellenpaket praktisch keine Überschussenergie, es gelangt schnell ins Potentialtal, von dem aus der größte Teil der langwelligen stimulierten Emission stattfindet. Bei höherenergetischer Anregung besitzt das Wellenpaket viel Überschussenergie, es braucht deshalb länger bis es zum Potentialtal

⁴Mit Gleichung 6.1 ergibt sich, daß die Oszillationsamplitude bei transformlimitierten Impulsen mit 12 fs Dauer etwa 3 mal stärker ist, als im Fall negativ gechirpter Impulse mit einer Dauer von 17 fs, und 15 mal stärker als im Fall positiv gechirpter Impulse mit einer Dauer von 22 fs.

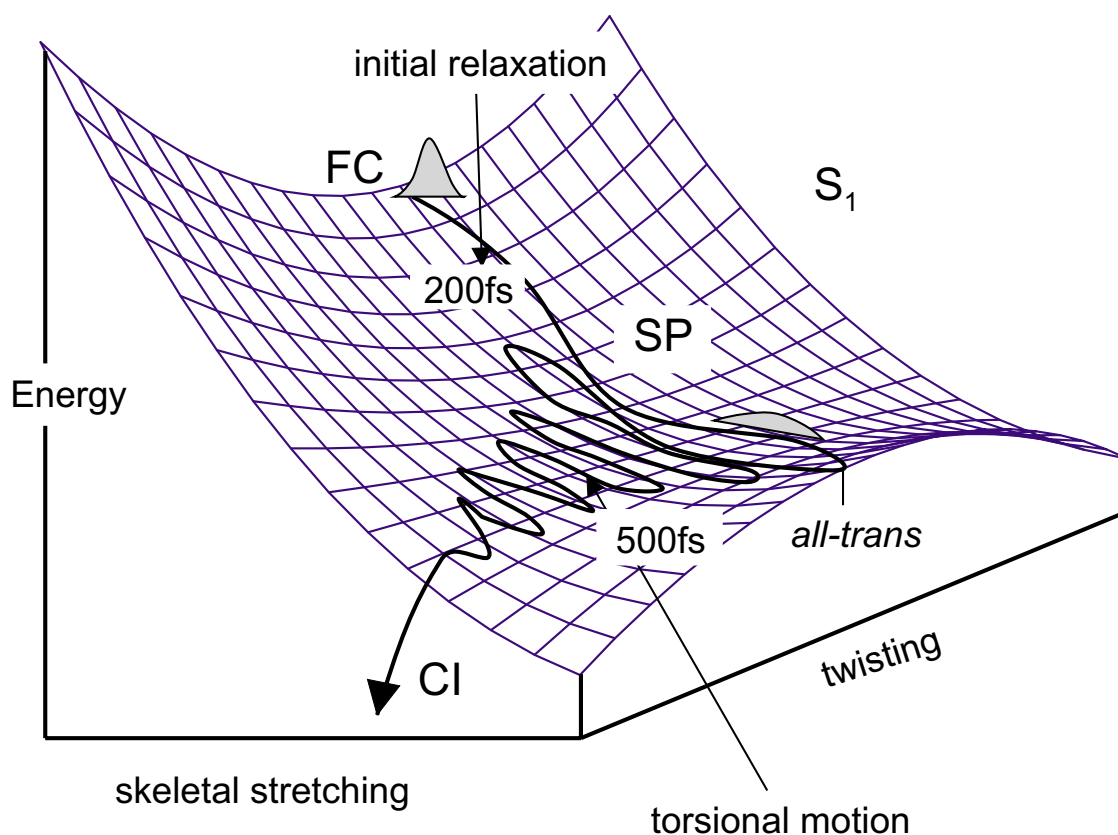


Abbildung 6.11: Darstellung der S₁-Potentialfläche nach [Gar98] mit leichten Modifikationen: außer der C=C-Streckschwingung, die von Olivucci et al. angenommen wurde, ist auch noch eine niederfrequenter Mode entlang der Torsionskoordinate zu sehen, die eventuell der HOOP-Schwingung entsprechen könnte. Das Wellenpaket benötigt in diesem Bild ca. 200 fs um von der Franck-Condon-Region in das Energietal zu gelangen, von dort weitere 500 fs bis zur konischen Durchschneidung.

gelangt.

Die Bewegung im Potentialtal zur konischen Durchschneidung (CI) ist vermutlich mit der beobachteten 500 fs-Komponente korreliert. Von der konischen Durchschneidung aus kann das Wellenpaket sowohl in den Ausgangszustand rekombinieren, als auch in die 13-cis Konfiguration reagieren.

Die auf dem relevanten Teil der angeregten S₁-Potentialfläche ablaufenden Reaktionen konnten ähnlich wie im theoretischen Modell an PSB11 (siehe Abbildung 6.11) erklärt werden. Allerdings konnten Rechnungen an BR keine konische Durchschneidung zwischen S₁- und S₀-Potentialfläche finden. Es bietet sich hier jedoch eine alternative Lösung an: Durch die Relaxation der C=C-Streckschwingung und der ersten Bewegung entlang der Isomerisierungscoordinate ist der zweite angeregte

Zustand S_2 stark abgesenkt, und es findet ein Übergang vom S_1 - auf den S_2 -Zustand statt, welcher eine konische Durchschneidung mit dem Grundzustand hat [Tav00]. Bei der Reaktion in den Grundzustand sollte also zunächst ein Übergang in den S_2 -Zustand erfolgen, bevor von dort dann die Reaktion in den Grundzustand sehr schnell erfolgt.

Die Meßergebnisse an BR konnten zeigen, daß die schnelle Isomerisierung des Retinals in BR nicht in einem eindimensionalen Modell entlang einer Reaktionskoordinate erklärt werden kann. Für eine schlüssige Beschreibung der Reaktion sind mindestens zwei Kernkoordinaten wichtig, die C=C-Streckschwingung- und eine Rotationskoordinate. Um einen Übergang aus dem elektronisch angeregten Zustand auf die Grundzustandspotentialfläche zu ermöglichen, muß erst ein Übergang auf den energetisch stark abgesenkten S_2 -Zustand stattfinden, von dort kann das Wellenpaket über eine konische Durchschneidung auf die Grundzustandspotentialfläche gelangen, und dort entweder in den Ausgangszustand rekombinieren, oder das erste Photoprodukt J bilden.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente mit höchster Zeitaufösung an Reaktionszentren des Photosynthesebakteriums *Rhodospseudomonas viridis* und an Bakteriorhodopsin des Bakteriums *Halobacterium salinarum* durchgeführt.

Der erste Teil der Arbeit befaßte sich mit der Temperaturabhängigkeit der ersten beiden Schritten der Elektronentransferreaktion in nativen und mutierten Reaktionszentren von *Rps. viridis*. Die temperaturabhängigen Messungen zur Bestimmung der Primärreaktionszeit wurden im Bereich der stimulierten Emission des ersten angeregten Zustandes zwischen 1020 nm und 1100 nm durchgeführt, die Temperaturabhängigkeit des zweiten Elektronentransferschrittes wurde erstmals am isosbestischen Punkt der B-Bande bei 822 nm bestimmt. Für die Primärreaktion des Wildtyps ergibt sich eine Beschleunigung der Elektronentransferzeit von 2.2 ps bei Raumtemperatur auf 1.1 ps bei 30 K. Eine Erweiterung der semiklassischen Theorie von Hopfield unter Berücksichtigung der möglichen Ausdehnung der Reaktionszentren mit der Temperatur und der damit verbundenen Verkleinerung der elektronischen Kopplung ermöglicht eine gute Anpassung der Meßdaten.

Die Mutante L168HF erwies sich schon in Raumtemperaturmessungen als besonders interessant, da die Zeit für den ersten Elektronentransferschritt mit 0.8 ps bei Raumtemperatur deutlich schneller ist, als im Wildtyp. Betrachtet man die Temperaturabhängigkeit läßt sich bis 150 K eine starke Beschleunigung auf 0.36 ps beobachten, weiteres Abkühlen auf 30 K verkürzt die Elektronentransferzeit nur noch wenig auf 0.25 ps. Interessanterweise zeigt die Zerfallszeit für den zweiten Elektronentransferschritt von P^* nach P^+B^- im Wildtyp und in der Mutante L168HF das gleiche Verhalten. In beiden Fällen lieferte eine Anpassung der Temperaturabhängigkeit mithilfe konventioneller nichtadiabatischer Theorien auch unter Berücksichtigung der Wärmeausdehnung keine Beschreibung der Meßergebnisse. Nachdem eine Erweiterung der nichtadiabatischen Formel für den adiabatischen Fall keine Verbesserung

der Datenanpassung bewirkte, wurde eine alternative Theorie entwickelt. Im Rahmen dieser Theorie, bei der ein Zusammenhang zwischen elektronischer Kopplung und Energie der Zustände angenommen wurde, kann die Temperaturabhängigkeit aller bisher beobachteten Elektronentransferprozesse in photosynthetischen Reaktionszentren konsistent erklärt werden.

Die Verbesserung der Zeitaufösung durch den Einsatz nichtlinearer optischer Verstärker als Quelle spektral durchstimmbarer, energiereicher Anregungsimpulse ermöglichte die Beobachtung von Wellenpaketen im ersten angeregten Zustand P^* des Reaktionszentrums. Mit einer Zeitaufösung von 90 fs konnte die Wellenpaketsbewegung im Bereich der stimulierten Emission und in der Absorptionsbande des Akzeptorzustandes P^+B^- in *Rps. viridis* erstmals beobachtet werden. Es konnten für den Wildtyp und die Mutante L168HF zwei Oszillationsfrequenzen $\omega_1 = 145 \text{ cm}^{-1}$ und $\omega_2 = 56 \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden, die mit Zeiten zwischen 200 fs und 800 fs gedämpft sind. Liegt die Elektronentransferzeit in der gleichen Größenordnung, wie dies bei tiefen Temperaturen in der Mutante L168HF der Fall ist, so ist der Ausgangszustand vor dem Elektronentransfer noch nicht vollständig relaxiert, der Elektronentransfer ist adiabatisch. Die Berechnung des Landau-Zener-Faktors, dessen Größe als Unterscheidungskriterium für die Adiabaticität einer Reaktion gilt, bestätigt diese Beobachtung. Während im Wildtyp der Landau-Zener-Faktor stets kleiner als 0.5 ist, ist der Wert des Landau-Zener-Faktors bei der Primärreaktion der Mutante schon ab etwa 130 K größer als eins. Somit ist hier eindeutig der Bereich adiabatischen Elektronentransfers erreicht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Isomerisierung von Retinal in Bakteriorhodopsin mit höchster Zeitaufösung (kleiner 40 fs) untersucht. Besonderer Wert wurde auf die Bestimmung des Zeitnullpunktes gelegt, da bisherige Isomerisierungsmodelle von einem leicht verzögertem Einsetzen der langwelligen stimulierten Emission (890 nm - 1000 nm) ausgingen. Die Messungen zeigen zwischen 890 nm und 1000 nm einen sehr schnellen Anstieg und ein Abknicken des Signals. Dieses Abknicken kann durch Einsetzen der stimulierten Emission verbunden mit einer Wellenpaketsbewegung im 800 cm^{-1} Bereich erklärt werden. Durch die hohe Zeitaufösung konnten vor allem im sichtbaren Spektralbereich ausgeprägte Oszillationen beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Oszillationsfrequenzen, die auf eine Wellenpaketsbewegung im angeregten Zustand zurückzuführen sind, und der gemessenen Reaktionszeiten von 200 fs, 500 fs und 3.5 ps wurde ein modifiziertes Reaktionsmodell für die Primärreaktion von Bakteriorhodopsin aufgestellt, das die verfügbaren experimentellen Beobachtungen berücksichtigt.

Literaturverzeichnis

- [Agg88] Aggarwal R., Sanchez A., Stuppi M., Fahey R., Strauss A., Rapoport W., Khattak C.: IEEE J. Quant. Electron. 24 (1988) 1003.
- [Arl93] Arlt T., Schmidt S., Kaiser W., Lauterwasser C., Meyer M., Scheer H., Zinth W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 11757.
- [Arl96a] Arlt T.: Femtosekundenspektroskopie schneller Transportprozesse in biologischen Systemen, Doktorarbeit, Technische Universität München (1996).
- [Arl96b] Arlt T., Bibikova M., Penzkofer H., Oesterhelt D., Zinth W.: J. Phys. Chem. 100 (1996) 12060.
- [Arl96c] Arlt T., Dohse B., Schmidt S., Wachtveitl J., E. L., Zinth W., Oesterhelt D.: Biochemistry 35 (1996) 9235.
- [Arl00] Arlt T., Huppmann P., Penzkofer H., Wachtveitl J., Zinth W.: in Vorbereitung.
- [Bar98] Bardeen C., Wang Q., Shank C.: J. Phys. Chem. A 102 (1998) 2759.
- [Ber93] Bergmann, Schäfer: Lehrbuch der Experimentalphysik, Optik, de Gruyter (1993).
- [Bie95] Biesdorf S.: Temperaturabhängigkeit der Primärschritte der Photosynthese von nativen und modifizierten Reaktionszentren von *Rhodobacter sphaeroides*, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1995).
- [Bix98] Bixon M., Jortner J.: preprint (1998).
- [Brä91] Bräuchle C., Hampp N., Oesterhelt D.: Advanced Materials 3 (1991) 420.
- [Bre85] Breton J.: Biochimica et Biophysica Acta 810 (1985) 235.

- [Bre88] Breton J., Martin J.L., Fleming G., Lambry J.C.: *Biochemistry* 27 (1988) 8276.
- [Cru88] Cruz C., Gordon J., Becker P., Fork R., Shank C.: *IEEE J. Quant. Electron.* 24 (1988) 261.
- [Dei89] Deisenhofer J., Michel H.: *EMBO Journal* 8 (1989) 2149.
- [DeV84] DeVault D.: *Quantum-mechanical tunneling in biological systems*, Cambridge University Press (1984).
- [Dex92] Dexheimer S., Wang Q., Peteanu L., Pollard W., Mathies R., Shank C.: *Chem. Phys. Lett.* 188 (1992) 61.
- [Dob87] Dobler J.: *Zeitaufgelöste Untersuchungen der photosynthetischen Reaktionen von Bakteriorhodopsin im elektronisch angeregten Zustand*, Doktorarbeit, Technische Universität München (1987).
- [Dob88] Dobler J., Zinth W., Kaiser W., Oesterhelt D.: *Chem. Phys. Lett.* 144 (1988) 215.
- [Doh95] Dohse B.: *Charakterisierung von spezifischen Mutanten des Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis**, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1995).
- [Dre86] Drews G., Oelze J.: *Biologie in unserer Zeit* 16 (1986) 113.
- [Dre91a] Dressler K.: *Femtosekunden-Spektroskopie zur photosynthetischen Primärreaktion des Purpurbakteriums *Rps. viridis**, Doktorarbeit, Technische Universität München (1991).
- [Dre91b] Dressler K., Umlauf E., Schmidt S., Hamm P., Zinth W., Buchanan S., Michel H.: *Chem. Phys. Lett.* 183 (1991) 270.
- [Du93] Du M., Fleming G.: *Biophys. Chem.* 48 (1993) 101.
- [Ebe94] Eberl U., Ogrodnik A., Michel-Beyerle M.: *Phys. Bl.* 50 (1994) 215.
- [Erm94] Ermler U., Fritsch G., Buchanan S., Michel H.: *Structure* 2 (1994) 925.
- [Feh75] Feher G., Hoff A., Isaacson R., Ackerson L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244 (1975) 239.

- [Feu97] Feurer T., Glass A., Sauerbrey R.: Appl. Phys. B 65 (1997) 295.
- [Fle88] Fleming G., Martin J., Breton J.: Nature 333 (1988) 190.
- [Fod88] Fodor S., Ames J., Gebhard R., van den Berg E., Stoeckenius W.: Biochemistry 27 (1988) 7097.
- [For83] Fork R., Shank C., Hirliman C., Tomlinson W.: Opt. Lett. 8 (1983) 1.
- [Fra86] Franz A.: Doktorarbeit, Technische Universität München (1986).
- [Fra87] Fraunfelder H., Hartmann H., Karplus M., Kuntz I., Kuriyan J., Parak F., Petsko G., Ringe D., Tilton R., Conolly M., Max N.: Biochemistry 26 (1987) 254.
- [Fra93] Franze S., Boxer S.: J. Phys. Chem. 97 (1993) 6304.
- [Gai98] Gai F., Hasson K., McDonald J., Anfinrud P.: Science 279 (1998) 1886.
- [Gal95] Gale G., Cavallari M., Driscoll T., Hache F.: Optics Lett. 20 (1995) 1562.
- [Gar98] Garavelli M., Negri F., Olivucci M.: preprint (1998).
- [Gol88] Goldstein R., Takiff L., Boxer S.: Biochim. Biophys. Acta 934 (1988) 253.
- [Gro90] Grossjean M., Tavan P., Schulten K.: J. Phys. Chem. 94 (1990) 8059.
- [Hac96] Hache F., Cavallari M., Gale G.: Ultrafast Visible Optical Parametric Oscillators: A Route to Tunable Sub-10-Femtosecond Pulses?, in *Ultrafast Phenomena X* (1996) .
- [Hah99] Hahn S., Stock G.: wird veröffentlicht in J. Phys. Chem. (2000).
- [Ham94] Hamm P.: Femtosekunden-Infrarotspektroskopie an bakteriellen Reaktionszentren von *Rhodobacter sphaeroides*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1994).
- [Ham95] Hamm P.: Chemical Physics 200 (1995) 415.
- [Han87] Hanson L., Fajer J.: J. Am. Chem. Soc. 109 (1987) 4728.
- [Har77] Hartmann R., Oesterhelt D.: Eur. J. Biochem. 77 (1977) 325.
- [Har84] Harbison G., Smith S., Pardo J., Winkel C., Lugtenburg J., Herzfeld J., Mathies R., Griffin R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 1706.

- [Har96] Haran G., Wynne K., Xie A., He Q., Chance M., Hochstrasser R.: Chem. Phys. Lett. 261 (1996) 389.
- [Har97] Hartl I.: Sub-Pikosekunden Emissionsmessungen zur Primärreaktion der bakteriellen Photosynthese, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1997).
- [Has96] Hasson K., Gai F., Anfinrud P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 15124.
- [Hau97] Haupts U., Tittor J., Bamberg E., Oesterhelt D.: Biochemistry 36 (1997) 2.
- [Hau99] Haupts U., Tittor J., Oesterhelt D.: Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 28 (1999) 367.
- [Hen90] Henderson R., Baldwin J., Ceska T., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.: J. Mol. Biol. 213 (1990) 293.
- [Hol89] Holzapfel W.: Aufklärung des ersten Schritts im Elektronentransport bei der Photosynthese von *Rb. sphaeroides*, Doktorarbeit, Technische Universität München (1989).
- [Hol90] Holzapfel W., Finkle U., Kaiser W., Oesterhelt D., Scheer H., Stilz H., Zinth W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 5168.
- [Hop76] Hopfield J.: Fundamental Aspects of Electron Transfer in Biological Membranes, in *Phénomènes électrique au niveau des membrane biologique. Proc. 29th Int. Congr. Societé Chimie Physique* (1976) .
- [Hub97] Huber H.: Ultrakurzzeitspektroskopie der Primärschritte der Photosynthese- eine Studie der Temperaturabhängigkeit und der Energetik-, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1997).
- [Hun89] Hunter C., van Grondelle R., Olsen J.: Trends in Biochem. Sci. 14 (1989) 72.
- [Hup96] Huppmann P.: Temperaturabhängigkeit des primären Elektronentransfers im photosynthetischen Bakterium *Rhodospseudomonas viridis*, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1996).

-
- [Hup98] Huppmann P., Spörlein S., Wachtveitl J., Zinth W.: Adiabatic Behaviour in the Primary Photosynthetic Electron Transfer, in *Ultrafast Phenomena XI* (1998) .
- [Hup00] Huppmann P., Kolbasov D., Scherz A., Wachtveitl J., Zinth W.: in Vorbereitung (2000).
- [Jea91] Jean J., Friesner R., Fleming G.: Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 95 (1991) 253.
- [Jor76] Jortner J.: The Journal of Chemical Physics 64 (1976) 4860.
- [Jor80] Jortner J.: Biochim.et Biophys. Acta 594 (1980) 193.
- [Kle92] Kleinherenbrink F., Deinum G., S.C.M. O., Hoff A., J. A.: Biochimica et Biophysica Acta 1099 (1992) 175.
- [Köp84] Köppel H., Domcke W., Cederbaum L.: Adv. Chem. Phys. 57 (1984) 59.
- [Koy91] Koyama Y., et al: Photochem. Photobiol. 54 (1991) 433.
- [Kuh98] Kuhlmann U., Rink J.: c't 3 (1998) 18.
- [Kuz98] Kuznetsov A., Ulstrup J.: Spectrochimica Acta Part A 54 (1998) 1201.
- [Law90] Lawlor D.: Photosynthese, Stoffwechsel - Kontrolle - Physiologie, Thieme (1990).
- [Lin90] Lin X.: Nonequilibrium Statistical Mechanics of Open and Closed Systems, VCH Publisher, Inc., eds. Lindenberg,K. and West, B. (1990).
- [Loc98] Lochbrunner S., Wilhelm T., Piel J., Huppmann P., Spörlein S., Riedle E.: Tunable Visible and NIR Parametric Amplifiers at 1 kHz and Pulse Lengths Down to 10 fs, in *Ultrafast Phenomena XI* (1998) .
- [Loc00] Lochbrunner S., Huppmann P., Riedle E.: in Vorbereitung (2000).
- [Log96] Logunov S., El-Sayed M., J.K. L.: Biophysical Journal 71 (1996) 1545.
- [Log97] Logunov S., El-Sayed M.: J. Phys. Chem. B 101 (1997) 6629.
- [Man90] Manthe U., Köppel H.: J. Chem. Phys. 93 (1990) 345.
- [Mar93] Marcus R.: Angewandte Chemie 105 (1993) 1161.

-
- [Mat88] Mathies R., Brito Cruz C., Pollard W., Shank S.: *Science* 240 (1988) 777.
- [Mat92] Mathis P., Sinning I., Michel H.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1098 (1992) 151.
- [McD95] McDermott G., Prince S., Freer A., Hawthornthwaite-Lawless A., Papiz M., Cogdell R., Isaacs N.: *Nature* 374 (1995) 517.
- [McM98] McMahan B., Müller J., Wraight C., Nienhaus G.: *Biophysical Journal* 74 (1998) 2567.
- [Mos92a] Moser C., Dutton P.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1101 (1992) 171.
- [Mos92b] Moser C., Keske J., Warncke K., Farid R., Dutton P.: *Nature* 355 (1992) 796.
- [Mou86] Moulton P.: *J. Opt. Soc. Am. B* 3 (1986) 125.
- [Mye83] Myers A., Harris R., Mathies R.: *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 603.
- [Mye87] Myers A., Mathies R.: *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, T.G. Spiro, Wiley-Interscience, New York (1987).
- [Näg98] Nägele T.: *Ultraschnelle Photoisomerisierung von Azobenzolen*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1998).
- [Nor71] Norris J., Uphaus R., Crespi H., Katz J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 625.
- [Nus85] Nuss M., Zinth W., Kaiser W., Kolling E., Oesterhelt D.: *Chem. Phys. Lett.* 117 (1985) 1.
- [Oes73] Oesterhelt D., Stoeckenius W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2853.
- [Oes74] Oesterhelt D., Stoeckenius W.: *Methods Enzymol.* 31 (1974) 667.
- [Oes93] Oesterhelt D., Marwan W.: *The Biochemistry of Archea (Archeabacteria)*, Elsevier Science Publishers B.V. (1993) .
- [Oes96] Oesterhelt D.: *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 100 (1996) 1943.
- [Oes98] Oesterhelt D.: *Current Opinion in Structural Biology* 8 (1998) 489.
- [Ogr88a] Ogrodnik A., Volk M., Letterer R., Feick R., Michel-Beyerle M.: *Biochimica et Biophysica Acta* 936 (1988) 361.

- [Ogr88b] Ogradnik A., Volk M., Michel-Beyerle M.: Plenum Press, New York (1988).
- [Ogr90] Ogradnik A.: *Biochimica et Biophysica Acta* 1020 (1990) 65.
- [Ort96] Ortega J., Mathis P., Williams J., Allen J.: *Biochemistry* 35 (1996) 3354.
- [Par98] Parak F.: Persönliche Mitteilung (1998).
- [Pel94] Peloquin J., Williams J., Lin X., Alden R., Taguchi A., Allen J., Woodbury N.: *Biochemistry* 33 (1994) 8089.
- [Pen95] Penzkofer H.: *Ultrakurzzeitspektroskopie an mutagenetisch veränderten Reaktionszentren: Energetik und Optimierung der primären Ladungstrennung der bakteriellen Photosynthese*, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1995).
- [Pet77] Pettei M., Yudd A., Nakanishi K., Henselman R., Stoeckenius W.: *Biochemistry* 16 (1977) 1955.
- [Pet87] Petrich J., Breton J., Martin J., Antonetti A.: *Chem. Phys. Lett.* 137 (1987) 369.
- [Pie98] Piel J.: *Erzeugung und Charakterisierung abstimmbarer ultravioletter 30-fs-Lichtimpulse*, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1998).
- [Pol86] Polland H.J., Franz F., Zinth W., Kaiser W., Kolling E., Oesterhelt D.: *Biophys. J.* 49 (1986) 651.
- [Pol89] Pollard W., Cruz C., Shank C., Mathies R.: *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 199.
- [Ran97] Ranka J., Gaeta A., Baltuska A., Pshenichnikov M., Wiersma D.: *Optics Lett.* 22 (1997) 1344.
- [Rei95] Reimers J., Hush N.: *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 1302.
- [Sch78] Schulten K., Tavan P.: *Nature* 272 (1978) 85.
- [Sch82] Schobert B., Lanyi J.: *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 10306.
- [Sch93] Schoenlein R., Peteanu L., Wang Q., Mathies R., Shank C.: in *Ultrafast Phenomena VIII* (1993) .

- [Sch94] Schmidt S.: Untersuchung der photosynthetischen Ladungstrennung in modifizierten bakteriellen Reaktionszentren mittels transienter Femtosekunden-Absorptionsspektroskopie, Doktorarbeit, Technische Universität München (1994).
- [Sch95] Schulten K., Humphrey W., Logunov I., Sheves M., Xu D.: Israel Journal of Chemistry 35 (1995) 447.
- [Sei94] Seidner L., Domcke W.: Chem. Phys. 186 (1994) 27.
- [Sei95] Seidner L., Stock G., Domcke W.: J. Chem. Phys. 103 (1995) 3999.
- [Sho87a] Shopes R., Levine L., Holten D., Wraight C.: Photosynthesis Research 12 (1987) 165.
- [Sho87b] Shopes R., Wraight C.: Biochimica et Biophysica Acta 893 (1987) 409.
- [Shu93] Shuvalov V.: Biophysics 38 (1993) 969.
- [Sma95] Small G.: Chemical Physics 197 (1995) 239.
- [Son98] Song L., El-Sayed M.: J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 8889.
- [Spe77] Sperling W., Carl P., Rafferty C., Dencher N.: Biophys. Struct. Mechanism 3 (1977) 79.
- [Spi91] Spinelli L., Coulliaud B., Goldblatt N.: Conference on Quantum Electronics and Laser Science 1 (1991) 583.
- [Spö97] Spörlein S.: Femtosekundenspektroskopie der Primärreaktion bakterieller Reaktionszentren im nahen infraroten Spektralbereich, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1997).
- [Spö98] Spörlein S., Zinth W., Wachtveitl J.: J. Phys. Chem. B (1998).
- [Spu84] Spudich J., Bogomolni R.: Nature 312 (1984) 509.
- [Spu92] Spudich J., Bogomolni R.: J. Bioenerg. Biomembr. 24 (1992) 193.
- [Sto67] StoECKENIUS W., R.J. R.: J. Cell. Biol. 34 (1967) 365.
- [Str88] Stryer L.: Biochemie, Spektrum, Akademischer Verlag (1988).
- [Str97] Streltsov A., Aartsma T., Hoff A., Shuvalov V.: Chem. Phys. Lett. 266 (1997) 347.

- [Tak85] Takahashi T., Tomoika H., Kamo N., Kobatake Y.: FEMS Microbiol. Lett. 28 (1985) 161.
- [Tak88] Takiff L., Boxer S.: Biochimica et Biophysica Acta 932 (1988) 495.
- [Tan90] Tang D., Johnson D., Jankowiak R., Hayes J., Small G., Tiede D.: Structure and marker mode of primary electron donor state absorption of photosynthetic bacteria: hole burned spectra, in *Perspectives in Photosynthesis, Proceedings of the 22. Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry* (1990).
- [Tav00] Tavan P.: persönliche Mitteilung (2000).
- [Tho91] Thoma R., Hampp N., Bräuchle C., Oesterhelt D.: Optics Letters 16 (1991) 651.
- [Tit90] Tittor J., Oesterhelt D.: FEBS 263 (1990) 269.
- [Tri90] Trissl H., Breton J., Peprez J., Dobek A., Leibl W.: Biochimica et Biophysica Acta 1015 (1990) 322.
- [Tur79] Turro N., McVey J., Ramamurthy V., Lechtken P.: Angewandte Chemie 91 (1979) 597.
- [Vos91] Vos M., J.-C. L., Robles S., Youvan D., Breton J., Martin J.L.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 8885.
- [Vos93] Vos M., Rappaport F., Lambry J.C., Breton J., Martin J.L.: Nature 363 (1993) 320.
- [Vos94] Vos M., Jones M., Hunter C., Breton J., Lambry J.C., Martin J.L.: Biochemistry 33 (1994) 6750.
- [Vos96] Vos M., Jones M., Breton J., Lambry J.C., Martin J.L.: Biochemistry 35 (1996) 2687.
- [Vos98] Vos M., Jones M., Martin J.L.: Chemical Physics 233 (1998) 179.
- [vS97] van Stokkum I., Beekman L., Jones M., van Brederode M., van Grondelle R.: Biochemistry 36 (1997) 11360.
- [Wal68] Wald G.: Science 162 (1968) 230.

- [Wan94] Wang Q., Schoenlein R., Peteanu L., Mathies R., Shank C.: *Science* 266 (1994) 422.
- [War80] Warshel A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3105.
- [War91] Warshel A., Chu Z., Hwang J.K.: *Chem. Phys.* 158 (1991) 303.
- [Wei83] Weiner A.: *IEEE J. Quantum Electron.* 19 (1983) 1276.
- [Wil97] Wilhelm T., Piel J., Riedle E.: *Optics Lett.* 22 (1997) 1494.
- [Wil98] Wilhelm T.: *Spektroskopie auf der 10 fs Zeitskala*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1998).
- [Woe77] Woese C., Fox G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5088.
- [Wra80] Wraight C., Stein R.: *FEBS Letters* 113 (1980) 73.
- [Ye99a] Ye T., Friedman N., Gat Y., Atkinson G., Sheves M., Ottolenghi M., Ruhman S.: *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 5122.
- [Ye99b] Ye T., Gershgoren E., Friedman N., Ottolenghi M., Sheves M., Ruhman S.: preprint (1999).
- [Zen32] Zener C.: *Proc. R. Soc. Lond. A* 137 (1932) 696.
- [Zha98] Zhang L., Friesner R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 13603.
- [Zho93] Zhou F., Windemuth A., Schulten K.: *Biochemistry* 32 (1993) 2291.
- [Zho96] Zhong Q., Ruhman S., Ottolenghi M., Sheves M., Friedman N., Atkinson G., Delaney J.: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 12828.
- [Zin91] Zinth W., Oesterhelt D.: *Photobiology* (1991) 531.
- [Zin98] Zinth W., Huppmann P., Arlt T., Wachtveitl J.: *Phil. Trans. R. Soc. Lon. A* 356 (1998) 465.
- [Zub86] Zuber H.: *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria: Structure, Interactions and Dynamics*, Michel-Beyerle, M.E. Springer Verlag Berlin (1986).

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. W. Zinth, für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, für sein Interesse an den Ergebnissen, die ausführlichen Diskussionen sowie für die Gelassenheit, mit der er einige überraschende Nachrichten aufnahm.

Herrn Prof. D. Oesterhelt, Dr. Marina Bibikova, Brigitte Kessler und Susanne von Gronau für die Herstellung der verschiedenen Proben, und die Beantwortung diverser biologischer Fragen.

Herrn Prof. E. Riedle, dessen Dynamik für eine schnelle Wiederaufnahme des Meßbetriebs sorgte.

Mein besonderer Dank gilt **Sebastian Spörlein, Stefan Lochbrunner und Sepp Wachtveitl**:

Sebi, der durch seine Hilfe beim Meßaufbau und unermüdliches Reparieren der Anlage einer langen ergebnislosen Durststrecke noch vor dem Umzug ein Ende bereitet hat.

Stefan, mit dem die Zusammenarbeit im neuen Gebäude ein exzellenter Anfang für weitere Ergebnisse war, und der sogar aus Kanada das Entstehen dieser Arbeit unterstützte.

Sepp, der trotz vieler Verpflichtungen stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatte, unermüdlich Fragen zu diversen Themen beantwortete und stets das richtige Paper zur Hand hatte.

Arne für die zu kurze, aber nichtsdestotrotz hervorragende Zusammenarbeit, und für seine Versuche, mir die Geheimnisse objektorientierten Programmierens zu erklären.

Matthias für seine enorme Hilfsbereitschaft in Büro und Labor (insbesondere bei Computerfragen), und für seine Keksvorräte, die manch lange Meßnacht versüßten.

Ingmar für die Konstruktion eines äußerst nützlichen Spritzenpumpstandes.

Erik für die Hilfe in elektronischen Fragen, und für den „Gummistiefel“.

Den Herren der Werkstatt, **Rudi Schwarz, Alfons Storck und Manfred Kolmsee** für die schnelle und zuverlässige Ausführung aller Aufträge und für die vielen guten Gespräche, die den Laboralltag auflockerten. Insbesondere **Rudi**, der aus meinen „Bildern“ technische Zeichnungen zauberte, und der mich ermutigte „ins kalte Wasser zu springen“.

Den Sekretärinnen **Petra Jansen und Barbara Podolski** für die vielen nützlichen Auskünfte, für die Hilfe beim Ausfüllen schwer verständlicher Formulare und bei der Bearbeitung der Bestellungen.

Allen anderen **Mitarbeitern des IMO**, die mit ihrer Freundschaft und Hilfsbereitschaft, den Weihnachtsfeiern, den Volleyballspielen, den Ausflügen und vielem mehr, dazu beigetragen haben, daß ich immer sehr gern an diese Zeit zurückdenken werde.

„Last but not least“ möchte ich **meiner Familie** danken: meinen Eltern, besonders meiner Mutter, die durch häufiges Babysitten erheblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, David, der nicht nur ein verständnisvoller Ehemann und Vater, sondern auch ein kompetenter Ansprechpartner für physikalische Fragen ist, und sich außerdem noch die Zeit nahm, die Arbeit Korrektur zu lesen, und Katrina, die sich schon in ihren ersten Lebenswochen mehr über Photosynthese anhören mußte, als sie vermutlich jemals wissen wollte.