

Vielkanal-Femtosekunden- Spektroskopie der Primärreaktionen von archaebakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich

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

vorgelegt von Ingo Lutz
aus München

4. Oktober 2001

Abgabedatum: 4. Oktober 2001
1. Gutachter: Prof. Dr. W. Zinth
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Rief
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2002

Kurzfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Primärreaktion der Photosensoren Sensorrhodopsin I und II aus dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* und Sensorrhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis* sowie die Durchführung vergleichender Messungen an dem zur selben Familie gehörenden Membranprotein Bakteriorhodopsin. Spektral aufgelöste Anreg-Abtast-Experimente im sichtbaren Spektralbereich ermöglichten dabei einen umfassenden Einblick in die schnellsten Prozesse nach der Lichtanregung. Da Femtosekundenlasersysteme mit den erforderlichen Spezifikationen zu Beginn dieser Arbeit noch nicht kommerziell erhältlich waren, musste zur Realisierung der Experimente ein Ti:Saphir-Laserszillator und ein CPA-Verstärker entwickelt werden, der die benötigten Lichtimpulse von ca. 100 fs Dauer und 1 mJ Ausgangsleistung bei hoher Stabilität lieferte.

Erste Hinweise auf das Verhalten der elektronisch angeregten Zustände der Sensorrhodopsine vermittelten die in einem modifizierten hochempfindlichen Ramanspektrometer aufgenommenen Fluoreszenzspektren. Dabei konnten erstmalig die Fluoreszenzquantenausbeuten der Sensorrhodopsine bestimmt werden und unter gewissen Annahmen auch die Lebensdauern ihrer elektronisch angeregten Zustände abgeschätzt werden.

Die Anreg-Abtast-Experimente wurden mit einer Zeitauflösung von ca. 100 fs im Spektralbereich von etwa 400 nm bis 700 nm durchgeführt, wobei Absorptionsänderungen im Promillebereich aufgelöst werden konnten. Innerhalb der ersten 200 fs nach der Lichtanregung wurden bei allen untersuchten Proben schnelle, nichtexponentielle Reaktionskinetiken beobachtet, die durch eine stark gedämpfte Abwärtssbewegung des auf der Potentialfläche des elektronisch angeregten Zustands präparierten Wellenpakets interpretiert werden können. Diese Ergebnisse stützen mehrdimensionale Modelle der Primärreaktion, bei denen der Isomerisierung des Retinals eine schnelle Relaxation hochfrequenter Schwingungsmoden vorausgeht.

Die Rückreaktion in den elektronischen Grundzustand und die damit verbundene Isomerisierung des Retinals verläuft im Fall des Photosensors Sensorrhodopsin II trotz der unterschiedlichen Grundzustandsspektren sehr ähnlich zu Bakteriorhodopsin. Bei Sensorrhodopsin I wurde jedoch eine sehr langsame Rückreaktion innerhalb einiger Pikosekunden beobachtet, die bei dem eingestellten pH-Wert vermutlich zumindest teilweise durch eine veränderte elektrostatische Wechselwirkung mit dem Gegenion der Schiffchen Base verursacht wird. Über den Vergleich mit Literaturdaten an Halorhodopsin und BR-Mutanten konnten Vermutungen, dass die Geschwindigkeit der Primärreaktion stark von dieser Wechselwirkung beeinflusst wird, weiter bestätigt werden.

Aus den aufgenommenen Daten konnten weiterhin die erst lückenhaft bekannten Photozyklen der Sensorrhodopsine um einige Schritte ergänzt werden und die Absorptionsquerschnitte der gefundenen Zwischenzustände berechnet werden. Schließlich konnte ein qualitatives Modell für die Primärreaktion der Familie der Retinalproteine vorgeschlagen werden, das als Grundlage für zukünftige Arbeiten dienen kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Sensorrhodopsine	5
2.1	Retinalhaltige Membranproteine der Halobakterien	5
2.2	Aufbau der Retinalproteine	7
2.3	Phototaxis und Farbsehen	8
2.4	Photozyklen und Signalübertragung	10
2.5	Proteinumgebung des Retinals	12
2.6	In dieser Arbeit untersuchte Proben	12
2.6.1	Sensorrhodopsin II aus <i>N. pharaonis</i> (pSRII)	14
2.6.2	Sensorrhodopsin I und II aus <i>H. salinarum</i> (sSRI, sSRII)	14
2.6.3	Bakteriorhodopsin aus <i>H. salinarum</i>	15
3	Primärreaktion der Retinalproteine	17
3.1	Ein eindimensionales Modell der Primärreaktion von BR	17
3.2	Mehrdimensionale Modelle der Retinalisomerisierung	20
3.3	Besonderheiten der Sensorrhodopsine	23
4	Fluoreszenzmessungen	25
4.1	Bestimmung der S_1 -Lebensdauern aus Absorptions- und Fluoreszenzspektren	25
4.2	Experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzquantenausbeuten	27
4.3	Ergebnisse	28

5	Erzeugung ultrakurzer, durchstimmbarer Lichtimpulse	33
5.1	Das Prinzip	33
5.2	Die Impulsquelle: der modengekoppelte Ti:Saphir-Laser	35
5.3	Der CPA-Verstärker	38
5.3.1	Aufbau des Verstärkerresonators und der Pulseinkopplung	39
5.3.2	Design von Expander und Kompressor	41
5.4	Der nichtkollineare optisch parametrische Verstärker (NOPA)	44
6	Ultrakurzzeitspektroskopie: Aufbau, Durchführung und Auswertung der Ver- suche	49
6.1	Das Anreg-Abtast-Experiment	49
6.1.1	Experimenteller Aufbau	49
6.1.2	Durchführung der Messungen	52
6.2	Datenauswertung	54
6.2.1	Durchführung der Korrekturen	55
6.2.2	Datenanpassung und Berechnung von Absorptionsquerschnitten	57
7	Ultrakurzzeitspektroskopie: Ergebnisse	63
7.1	Bakteriorhodopsin	63
7.2	Sensorrhodopsin II (sSR II und pSR II)	66
7.3	Sensorrhodopsin I (sSR I)	73
8	Diskussion	77
8.1	Übersicht der ermittelten Zeitkonstanten	77
8.2	Die Primärreaktion von Bakteriorhodopsin	77
8.3	Sensorrhodopsine	80
8.3.1	Sensorrhodopsin II	80
8.3.2	Sensorrhodopsin I	83
8.4	Ein Reaktionsmodell für die Retinalproteine und Ausblick	86
9	Zusammenfassung	89

1 Einleitung

Die Photosynthese stellt den mit Abstand bedeutendsten chemischen Prozess auf der Erde dar. Mit einem geschätzten Energieumsatz von $2-4 \times 10^{18}$ kJ/Jahr und einem Umsatz von 200-300 Milliarden Tonnen CO_2 pro Jahr sichert sie die energetischen und entropischen Voraussetzungen für unsere Biosphäre [77]. Ein detailliertes Verständnis der Photosynthese auf molekularer Ebene ist daher seit langem Wunschtraum und Ziel naturwissenschaftlicher Forschung.

Die ältesten photosynthetischen Systeme finden sich bei Bakterien. Die verschiedenen zur Photosynthese nötigen funktionellen Einheiten sind hier einfacher aufgebaut und lassen sich leichter verstehen und besser voneinander trennen als bei den Photosystemen der Pflanzen. Als geeignete Modellsysteme für die Photosyntheseforschung stellten sich zum einen Purpurbakterien wie *Rhodospseudomonas viridis* oder *Rhodobacter sphaeroides* heraus, besonders da bereits Mitte der achtziger Jahre die Molekülstruktur des photosynthetischen Reaktionszentrums aufgeklärt werden konnte [15]. Zum anderen wurde eine sehr einfache Form der Photosynthese bei den sogenannten Archaeobakterien entdeckt, unter denen vor allem der Salinenbewohner *Halobacterium salinarum* Berühmtheit erlangt hat.

Der erste Schritt bei jeder Art von Photosynthese ist ein von der Energie des einstrahlenden Licht angetriebener Transport von Ladung über eine Membran. In *Halobacterium salinarum* geschieht dieser Schritt in dem Membranprotein Bakteriorhodopsin. Nach Absorption eines Photons gibt Bakteriorhodopsin ein Proton an den Zellaußenraum ab und nimmt anschließend ein weiteres Proton aus dem Innenraum der Zelle auf. Neben dem Bakteriorhodopsin, das Gegenstand umfangreicher Forschungsarbeiten wurde, findet sich aber in der Zellwand der Archaeobakterien eine ganze Familie ähnlicher Membranproteine, die biologisch recht unterschiedliche Funktionen erfüllen. Dazu zählen die Chloridpumpe Halorhodopsin und die in dieser Arbeit vor allem untersuchten Photorezeptoren, die Sensorrhodopsine.

Wachsendes Interesse an der Familie der Retinalproteine aus Archaeobakterien ist heute vor allem durch die fruchtbare interdisziplinäre Zusammenarbeit von Biologie, Biochemie und Physik entstanden, die gleichermaßen zu einem Gesamtverständnis beitragen:

- Fortschritte im Bereich der Gentechnik ermöglichen erstmals die Gewinnung der Proteine in großen Mengen sowie die Herstellung gezielt mutierter Varianten, so

1 Einleitung

dass detaillierte Untersuchungen der gesamten Familie möglich werden.

- Kristallisationsmethoden und Röntgenstrukturuntersuchungen liefern verbesserte 3D-Strukturen von Membranproteinen
- Leistungsstarke Computer und verfeinerte Algorithmen ermöglichen den zunehmenden Einsatz von genauen quantenmechanischen Rechenmethoden für die Simulation der Molekulardynamik.
- Große Fortschritte in der Lasertechnik ermöglichen eine direkte Untersuchung schnellster chemischer Reaktionen im sichtbaren und infraroten Spektralbereich.

Die archaebakteriellen Retinalproteine durchlaufen nach der Lichtanregung einen komplizierten Reaktionszyklus, dessen erster Schritt immer eine Isomerisierungsreaktion des eingebauten Farbstoffs Retinal ist. Die Proteinumgebung wirkt dabei als Katalysator, der die Effektivität und Selektivität der Isomerisierung gegenüber der Photoreaktion von freiem Retinal drastisch erhöht. Die mit der Isomerisierung zusammenhängenden Primärreaktionen laufen innerhalb der ersten Pikosekunden nach der Lichtanregung ab und wurden bei den Ionenpumpen BR und HR bereits in zahlreichen Arbeiten untersucht. Obwohl man heute viele Details dieses Reaktionsschritts kennt, fehlen doch noch entscheidende Teile für ein komplettes Bild der Primärreaktion von BR auf molekularer Ebene [26].

In den letzten Jahren ist es zum ersten mal gelungen, auch die anderen Mitglieder der Familie der Retinalproteine der Archaeobakterien, die Sensorrhodopsine, in ausreichenden Mengen und großer Reinheit herzustellen. Mit Hilfe dieser Sensoren haben die Archaeobakterien eine Art primitives Farbsehen entwickelt, das ihnen ermöglicht, schädlicher UV-Strahlung zu entfliehen und Regionen mit photosynthetisch gut verwertbarem Licht im grünen und orangen Spektralbereich anzusteuern [90].

Dank der weiterentwickelten Herstellungsverfahren eröffnete sich die Möglichkeit auch die Photoreaktionen dieser Sensoren genauer zu studieren. Unter anderem stellt sich z.B. die Frage, ob die veränderte Funktion der Proteine bereits durch den Verlauf der Primärreaktion bestimmt wird. Bevor allerdings komplexe Fragestellungen diskutiert werden können, muss freilich zuerst die Primärreaktion der Sensorrhodopsine genau untersucht werden, was im Rahmen dieser Dissertation durch spektral aufgelöste Anreg-Abtast-Experimente mit hoher Zeitauflösung (ca. 100 fs) und Dauerstrich-Fluoreszenzmessungen geschehen ist. Aufgrund dieser Daten konnten erste Modellvorstellungen entwickelt werden.

2 Sensorrhodopsine

Dieses Kapitel soll eine kurze Zusammenfassung der Photosynthese in halophilen Archaeobakterien liefern und einen Überblick über die in diesen Bakterien vorhandenen Sensorrhodopsine geben, die als Photosensoren eine entscheidende Rolle bei der Nutzung von Lichtenergie spielen. Außerdem werden die in dieser Arbeit untersuchten Proben charakterisiert.

Die Entdeckung der Archaeobakterien Ende der 70er Jahre brachte die bis dahin allgemein akzeptierte Einteilung der Lebewesen in Prokaryoten (Bakterien) und Eukaryoten (Lebewesen mit Zellkernen) durcheinander, da Archaeen zwar offenbar Bakterien sind, aber genetisch enger mit den Eukaryoten verwandt sind als die herkömmlich bekannten Bakterien, die auch Eubakterien genannt werden (ausführliche Informationen zu diesem Thema finden sich in [64]). Archaeen sind vor allem deshalb interessant, weil sie in unterschiedlich extremen, äußerst lebensfeindlichen Umgebungen (heiße Quellen, Schwefelquellen, Salinen) angetroffen werden, wo sie eine Vielzahl von Strategien zum Überleben und zur Energiegewinnung unter extremen Umständen entwickelt haben. Dazu gehört auch eine relativ einfache (Chlorophyll-freie) Form der Photosynthese, die ein gutes und robustes Modellsystem für detaillierte Forschungen darstellt.

2.1 Retinalhaltige Membranproteine der Halobakterien

Die in dieser Arbeit untersuchten Sensorrhodopsine stammen aus zwei verschiedenen halophilen Archaeobakterien, dem *Halobacterium salinarum* und dem *Natronobacterium pharaonis*. Halobakterien leben in Gewässern mit extrem hoher Salzkonzentration (z.B. Salinen), die sogar die Sättigungskonzentration ($\sim 4\text{M}$) erreichen kann. Natronobakterien benötigen neben der hohen Salzkonzentration auch noch extrem basische Gewässer im pH-Bereich zwischen 8,5 und 11.

Abbildung 2.1 zeigt schematisch den Aufbau des Bakteriums *Halobacterium salinarum*. *H. salinarum* ist der am besten bekannte Vertreter der halophilen Archaeobakterien. In Abb. 2.1 sind nur die Bestandteile der Zellmembran dargestellt, die für die hier diskutierten Vorgänge relevant sind. *H. salinarum* kann seine Energieversorgung durch Atmung, anaerobe Stoffwechselwege (Argininfermentation) und die retinalabhängige Photosynthese sicherstellen.

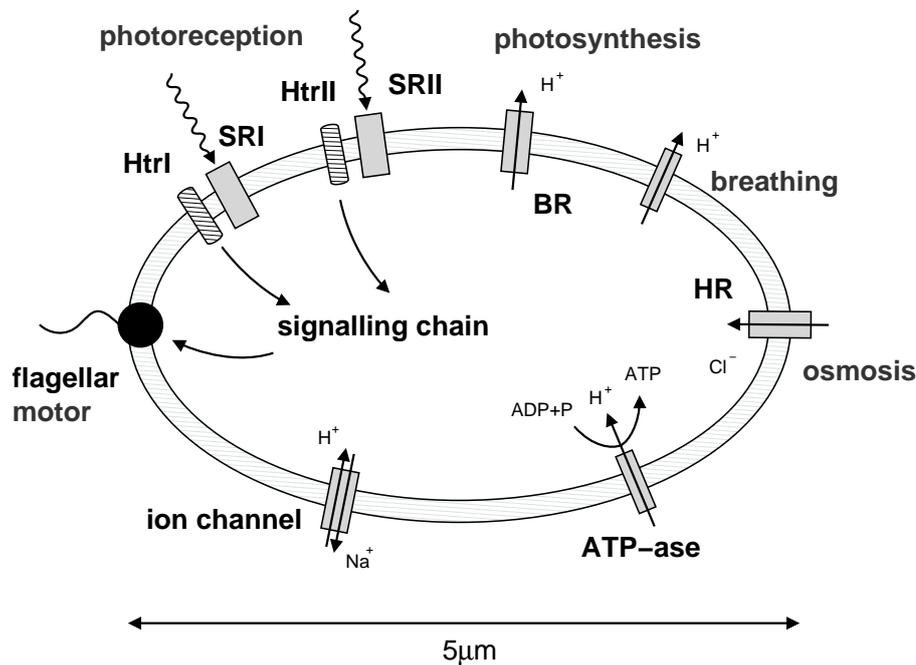


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Bakteriums *Halobacterium salinarum*.

In seiner Zellwand finden sich die vier retinalhaltigen Membranproteine Bakteriorhodopsin (BR), Halorhodopsin (HR), Sensorrhodopsin I (SRI) und II (SRII). Alle vier Proteine sind strukturell eng verwandt und durchlaufen nach der Absorption eines Photons komplizierte Photozyklen, in deren Verlauf sie ihre speziellen Funktionen erfüllen.

Der bekannteste Vertreter dieser Proteinfamilie ist die Protonenpumpe BR, die Lichtenergie absorbiert und damit Protonen durch die Zellmembran pumpt. Der entstehende Protonengradient dient dann wiederum als treibende Kraft für diverse Prozesse in der Zelle, z. B. für die ATP-Synthese oder die Fortbewegung mittels des Geißelmotors. Weiterhin wird die in dem Protonengradienten zwischengespeicherte Energie zum Transport diverser Ionen durch die Zellmembran genutzt. Auf diese Weise kann die Zelle auch Energie in chemischer Form für lange Dunkelzeiten speichern. Eine genauere Beschreibung dieser verschiedenen biochemischen Prozesse findet sich in [62].

Obwohl das *Natronobacterium pharaonis* in seinem Aufbau viele Gemeinsamkeiten mit *H. salinarum* zeigt [83], findet sich jedoch in seiner Zellmembran keine mit BR vergleichbare Protonenpumpe [46] und es kann auch keine Energie aus Argininfermentation gewinnen [82]. Beide Bakterien besitzen hingegen eine lichtgetriebene Chloridionenpumpe, das Halorhodopsin (HR), die für ihr Überleben unbedingt erforderlich ist, da die Zelle mit ihrer Hilfe den osmotischen Druck regulieren kann.

Beide Bakterien verfügen außerdem mit den Sensorrhodopsinen über Photosensoren,

mit denen sie ihr Schwimmverhalten der Lichteinstrahlung anpassen. Während sich in *H. salinarum* die Photorezeptoren sSRI¹ und sSRII² finden, mit deren Hilfe ein einfaches Farbsehen realisiert ist, konnte in *N. pharaonis* lediglich ein Sensorrhodopsin, nämlich pSRII³, identifiziert werden.

Die Sensorrhodopsine treten in der Zellmembran gemeinsam mit einem zugehörigen Signalübertragungsprotein (Transducer) auf, das ein detektiertes Signal (Absorption eines Photons) an eine komplexe biochemische Signalkette im Zellinneren weiterleitet. Der zu SRI gehörige Transducer wird mit HtrI bezeichnet, der Transducer von SRII entsprechend mit HtrII.

2.2 Aufbau der Retinalproteine

Aus Röntgenstrukturuntersuchungen sind die Strukturen von BR und HR mit Auflösungen von 1.55 Å bzw. 1.8 Å bekannt [58, 51]. Die Untersuchung der sterischen Eigenschaften und des hydrophilen Charakters der Aminosäuren in den bekannten Sequenzen der Sensorrhodopsine (siehe [46]) lässt zu den Ionenpumpen sehr ähnliche Strukturen erwarten. Für SRI wurden auf Basis der BR-Struktur bereits detaillierte Strukturmodelle entwickelt [54].

In Abb. 2.2 ist die Struktur von BR schematisch gezeigt (Protein Data Bank, Struktur 1C3W). Das Protein besitzt sieben Alpha-Helizes, die die Zellmembran durchspannen. In der Mitte ist der Chromophor Retinal (violett) zu erkennen, der an die Aminosäure Lys216⁴ kovalent über eine Schiffische Base gebunden ist. Je nach pH-Wert der Umgebung kann diese Schiffische Base protoniert oder deprotoniert sein. In Abb. 2.2 ist außerdem die Aminosäure Asp85 zu sehen, die eine wichtige Rolle als Protonenakzeptor und Gegenion der Schiffischen Base spielt (siehe 2.4).

Für die in dieser Arbeit untersuchte Primärreaktion der Retinalproteine ist vor allem die Wechselwirkung zwischen dem Retinal und den es unmittelbar umgebenden Aminosäuren entscheidend. Zieht man alle Aminosäuren in Betracht, deren kleinster Abstand zum Retinal höchstens 5 Å beträgt, so kommt man auf 21. Die aus diesen Seitenketten geformte Umgebung des Chromophores wird im folgenden auch als Bindungstasche bezeichnet. 13 dieser 21 Aminosäuren sind in allen bisher untersuchten Sequenzen der Retinalproteine BR, HR und SRI aus unterschiedlichen Spezies exakt konserviert [46]. In

¹ der kleine Buchstabe s in sSRI bedeutet *H. salinarum*, d. h. die Primärsequenz des Proteins stammt aus dem Erbgut von *H. salinarum* (und nicht aus einem anderen Archae-Bakterium). Im folgenden wird jedoch weiterhin auch die Abkürzung SRI verwendet, wenn die genaue Herkunft der Proteinsequenz im momentanen Zusammenhang keine Rolle spielt.

²SRII aus *H. salinarum* (siehe Fußnote 1)

³SRII aus *N. pharaonis* (siehe Fußnote 1)

⁴In der hier verwendeten Schreibweise bezeichnet ein Kürzel aus drei Buchstaben den Namen der Aminosäure (hier Lysin) und die angehängte Zahl die Position dieser Aminosäure in der Primärsequenz des Proteins.

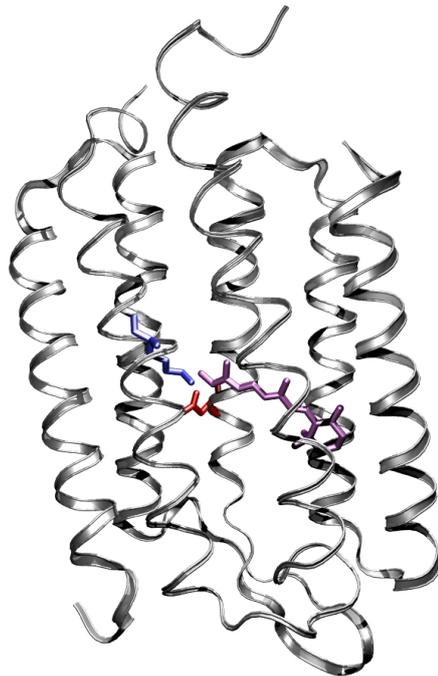


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Struktur von BR. Neben dem Proteinrückgrat ist der Chromophor Retinal (violett) und die Aminosäuren Lys216 (blau) und Asp85 (rot) gezeigt (Quelle: PDB 1C3W).

SRII dagegen sind nur 10 dieser 21 Positionen erhalten. In allen Retinalproteinen außer HR findet man außerdem ein Aspartat, das dem Protonenakzeptor und Gegenion Asp85 funktionell entspricht. Die entsprechenden Aminosäuren zu Asp85 in BR sind Asp76 in sSRI [75], Asp73 in sSRII [89, 6] und Asp75 in pSRII [22].

2.3 Phototaxis und Farbsehen

Als Phototaxis wird die Fähigkeit der Bakterien bezeichnet, ihren Schwimmkurs in Folge von Lichtreizen aus ihrer Umgebung zu korrigieren. Über die Abhängigkeit dieser Schwimmbewegungen von der Wellenlänge eingestrahelter Lichtreize konnten Rückschlüsse auf vorhandene Photosensoren und deren Eigenschaften gezogen werden. Diese Methode ist vor allem in Kombination mit gezielter genetischer Veränderung der Zellen aufschlußreich. Anfang der achtziger Jahre wurde auf diese Weise durch Untersuchungen an Mutanten von *Halobacterium salinarum*, denen die bis dahin bekannten Retinalproteine Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin fehlten (Flx-Mutanten), zunächst ein weiteres Retinalprotein, das Sensorrhodopsin I (SRI), entdeckt [9].

SRI detektiert oranges Licht bei ~ 580 nm, das von den Bakterien zur Photosynthese mit BR benötigt wird. In Folge der Lichtabsorption wird unter anderem ein Zwischenzustand mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 370 nm gebildet (SRI₃₇₃ in Abb. 2.3), der nach etwa einer Sekunde in den Grundzustand relaxiert. Dieser Prozess führt zu einer attraktiven Reaktion der Zellen, d. h. sie schwimmen verstärkt in Richtung der Lichtquelle, indem das (spontan auftretende) Umschalten des Flagellendrehsinns unterdrückt wird. Absorbiert das ultraviolette Photoprodukt von SRI aber seinerseits ein zweites Photon, erreicht das Molekül seinen Ausgangszustand bedeutend schneller und die Reaktion der Zelle ist repulsiv. Mit einem einzigen Typ von Photosensor ist für die Zelle also bereits Zweifarbensehen möglich [90, 91], so dass sie zwischen nutzbarem Licht und gefährlicher UV-Strahlung unterscheiden kann. Allerdings kann die Zelle die UV-Photonen natürlich nur bei gleichzeitig vorhandener oranger Hintergrundstrahlung wahrnehmen. Der gesamte Photozyklus von SRI ist schematisch in Abb. 2.4 dargestellt.

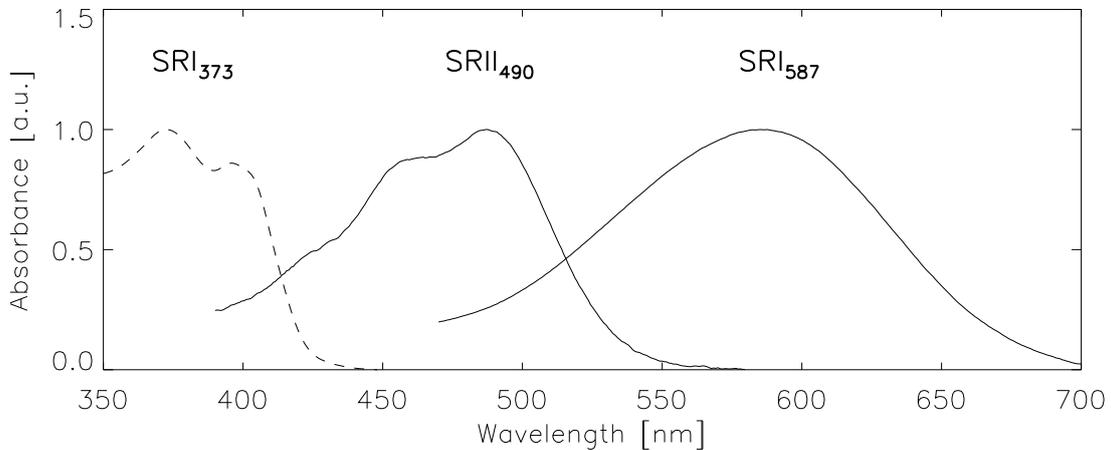


Abbildung 2.3: (Grundzustands-)Absorption der Photosensoren sSRI und sSRII und Absorptionsspektrum von SRI₃₇₃ (skizziert nach [91]).

Die Wellenlängenabhängigkeit der phototaktischen Messungen und das Absorptionsverhalten von SRI stimmten allerdings nicht vollständig überein. Bei genaueren Untersuchungen dieser Abweichungen wurde einige Jahre später ein weiteres Retinalprotein in *H. salinarum* entdeckt [95, 104, 61]. Dieser Sensor absorbiert im blau-grünen Spektralbereich (siehe Abb. 2.3) und wurde Sensorrhodopsin II (SRII) oder auch Phoborhodopsin (pR) genannt, weil auch seine Aktivierung eine repulsive Reaktion der Zellen auslöst.

Ein zu SRII aus *H. salinarum* (sSRII) sehr ähnliches Retinalprotein wurde auch in *N. pharaonis* entdeckt [8, 37, 82, 83] (in dieser Arbeit pSRII genannt). Sein Absorptionsspektrum gleicht dem von sSRII abgesehen von einer leichten Rotverschiebung von ca. 10 nm. Da *N. pharaonis* keine Photosynthese betreibt, liegt die Vermutung nahe, dass sich die Bakterien mit Hilfe dieser Sensoren von gefährlicher UV-Strahlung fernhalten. Das Absorptionsmaximum von SRII fällt in etwa mit dem Maximum der spektralen In-

tensität der Sonneneinstrahlung auf der Erdoberfläche zusammen. In *H. salinarum* wird SRII vor allem unter stark aeroben Bedingungen gebildet, d.h. wenn das Bakterium keine Photosynthese betreibt und daher die Dunkelheit vorzieht [81].

2.4 Photozyklen und Signalübertragung

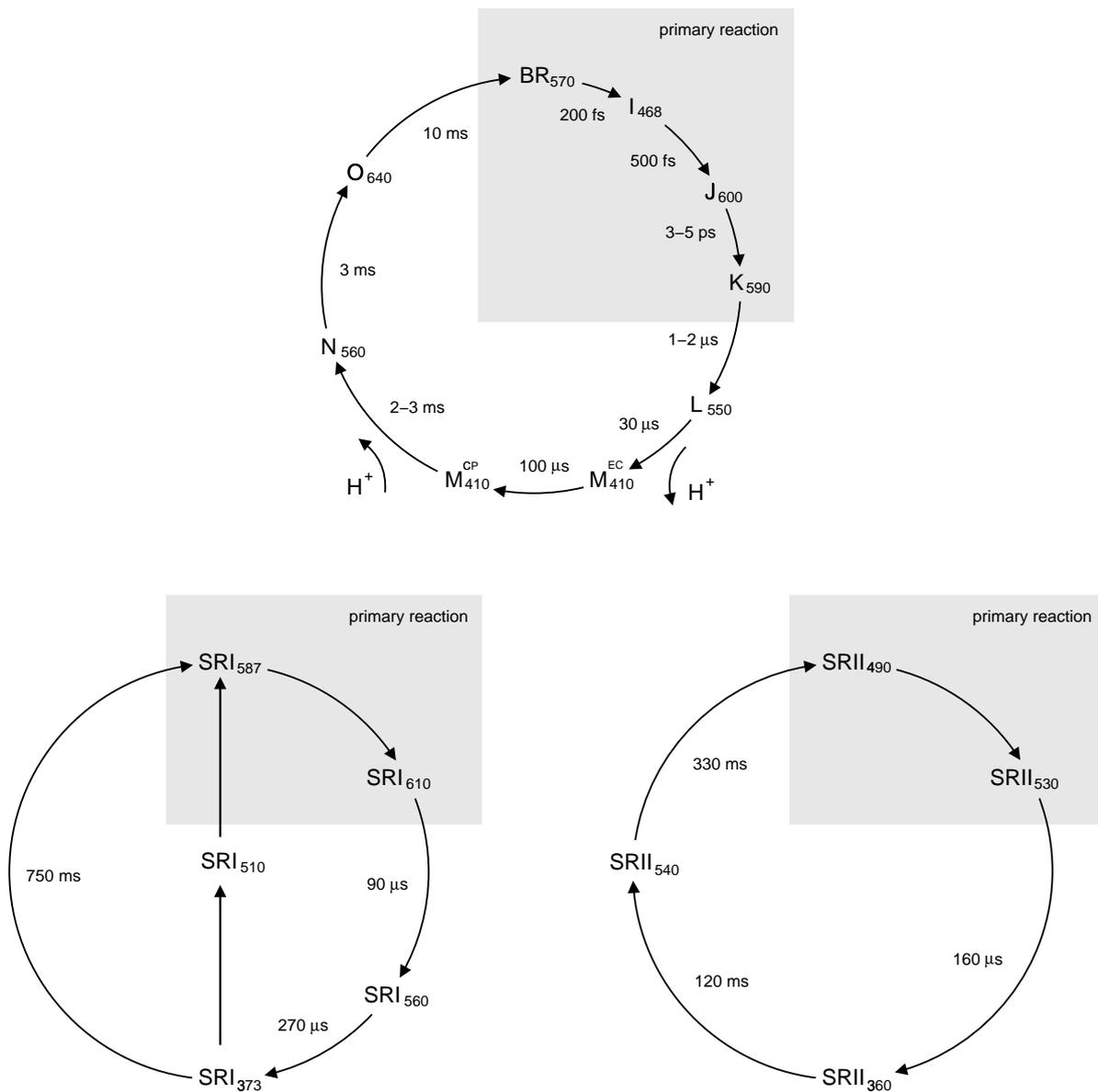


Abbildung 2.4: Photozyklen von BR [68], sSRI und sSRII nach [56, 62]

Die Photozyklen von BR, sSRI und sSRII sind in Abb. 2.4 dargestellt. Mit verschiedensten experimentellen Methoden wie zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie (Blitzlicht-photolyse) [10, 98, 57, 56, 47] oder Dauerstrichspektroskopie bei tiefen Temperaturen [48] konnten bisher die gezeigten Intermediate der Photosensoren charakterisiert werden. Die Lebensdauern dieser Zwischenzustände liegen im Bereich von Mikrosekunden bis zu ca. einer Sekunde. Die Angabe von Lebensdauern der Intermediate und ihrer genauen Absorptionsmaxima (Indizes in Abb. 2.4) ist bei den Sensorrhodopsinen allerdings schwierig, da der Verlauf des Photozyklus davon abhängt, ob das Protein in gelöster Form oder als Komplex mit dem zugehörigen Signaltransducer (Htr) beobachtet wird. Außerdem können Messungen an rekonstituierten Membranen oder am freien Protein in Lösung durchgeführt werden. Unter Umständen spielt zudem der pH-Wert für das Absorptionsverhalten und die Kinetik der Proteine eine Rolle. Einige dieser Effekte werden im Verlauf des Kapitels noch genauer diskutiert.

Bei allen drei betrachteten Retinalproteinen wird unmittelbar nach der Lichtabsorption auf der Pikosekunden-Zeitskala ein rotverschobenes Intermediat gebildet, das bei BR mit dem Buchstaben K bezeichnet wird. Dieser Teil des Photozyklus wird im Allgemeinen als Primärreaktion bezeichnet (graue Kästen in Abb. 2.4). Die Primärreaktion umfasst insbesondere die Isomerisierung des Retinals und wird in Kapitel 3 behandelt.

Während des BR-Photozyklus wird das Proton der anfänglich protonierten Schiffchen Base an die Aminosäure Asp85 abgegeben und gelangt über weitere Reaktionsschritte in den extrazellulären Raum. Die Deprotonierung der Schiffchen Base äußert sich in einer starken Blauverschiebung des Absorptionsspektrums. Das entstehende Intermediat wurde bei BR mit dem Buchstaben M bezeichnet (genauer M_{410} , der analoge Zwischenzustand ist SRI_{373} in sSRI und $SRII_{360}$ in sSRII). Im weiteren Verlauf der Reaktion ändert sich die Zugänglichkeit der Schiffchen Base von BR so, dass ihre Reprotonierung nun von der cytoplasmatischen Seite her erfolgt. Dieser Mechanismus führt damit in der Summe zum Transport eines Protons durch die Membran.

Bei den Sensorrhodopsinen ist der M-ähnliche Zustand mit einer Konformationsänderung verbunden, die zur Signalübertragung an das gekoppelte Transducerprotein führt [62]. Die lange Lebensdauer des M-Intermediates ist dabei für die Übertragung der Signale entscheidend [110, 109]. In der Zelle treten die Sensorrhodopsine stets als stöchiometrischer Komplex zusammen mit dem zugehörigen Transducer (HtrI bei SRI und HtrII bei SRII) auf. Der Transducer ist für die Weiterleitung des detektierten Ereignisses an eine komplexe biochemische Signalkette im Zellinneren verantwortlich, die schließlich zu einer Steuerung der Zellbewegung führt.

Neben dieser Funktion beeinflussen die Transducer aber auch die Stabilität der Sensorrhodopsine und die pH-Abhängigkeit der Photozyklen, insbesondere den Protonierungsgrad bzw. den pK-Wert der Schiff-Base. In Abwesenheit von HtrI ist der Photozyklus von SRI stark pH-abhängig, wobei insbesondere die Protonierung der Aminosäure Asp76 beeinflusst wird ($pK_a \sim 7$). Unterhalb pH7 findet man eine blaue Form ($\lambda_{max} = 587$ nm), ähnlich der komplexierten Form, oberhalb pH7 dagegen ist Asp76 deprotoniert und SRI

kann wie BR Protonen durch die Zellmembran pumpen [75].

Im Fall von freiem SR_{II} konnte unabhängig vom pH-Wert keine Pumpaktivität beobachtet werden. Die Kinetik der späten Intermediate im Photozyklus (M- und O-ähnliche Zustände) wird bei sSR_{II} aber auch stark vom pH-Wert beeinflusst [80]. Bei pSR_{II} dagegen wurde keine pH-Abhängigkeit der Dynamik auf der Mikrosekunden bis Sekunden-Zeitskala beobachtet [14].

2.5 Proteinumgebung des Retinals

Wie bereits erwähnt, wird die Bindungstasche des Retinals in BR aus 21 Aminosäuren gebildet, von denen 10 in allen bisher bekannten Gensequenzen der Retinalproteine aus Archaeen konserviert sind. Da die Absorption des Retinals der experimentell am besten zugängliche Sensor für die Retinalumgebung ist, wurden bereits verschiedene Versuche unternommen, die Ursachen für die verschiedenen Verschiebungen der Grundzustandsabsorptionen von BR, HR, SRI und SR_{II} gegenüber der Absorption von freiem Retinal (Opsin-Shifts) aufzuklären. Da auch für die in dieser Arbeit untersuchte Primärreaktion die unmittelbare Proteinumgebung des Retinals ausschlaggebend sein dürfte, bestand die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Opsin-Shift und Primärdynamik besteht.

Wie oben schon erwähnt ist der Protonierungszustand der Schiffischen Base ein wichtiger, das Absorptionsverhalten bestimmender Faktor. Takahashi et al. [96] schlagen als Ursache für die Blauverschiebung des Spektrums von SR_{II} gegenüber BR eine planarere Konfiguration des Retinals und eine stärkere Wechselwirkung zwischen Schiffischer Base und dem Gegenion vor. Auch wurden viele Mutationsexperimente durchgeführt, um die für die spektralen Verschiebungen verantwortlichen Aminosäuren zu identifizieren. Zwar konnte bei Mutation der Aminosäure Met118 eine große Blauverschiebung des Spektrums von BR beobachtet werden [30], eine Mutation an der entsprechenden Stelle von pSR_{II} führte aber zu keiner Farbveränderung [87]. Die Vermutung, dass die drei Mutationen im Bereich der Bindungstasche, die SR_{II} von den übrigen Retinalproteinen unterscheiden, für die starke Farbverschiebung des Chromophores in SR_{II} verantwortlich sind, bestätigte sich ebenfalls nur teilweise [87].

2.6 In dieser Arbeit untersuchte Proben

Eine genaue Beschreibung der gentechnischen Verfahren, mit denen die in dieser Arbeit untersuchten Sensorrhodopsinproben hergestellt wurden, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Dennoch ist es wichtig, einen ungefähren Überblick über die Probenherstellung und Probeneigenschaften zu erhalten, da dies für die korrekte Durchführung der Experimente und für die Interpretation der Daten von Bedeutung ist.

Der erste Schritt in der Herstellung ist die Konstruktion eines Plasmidvektors, der die

gewünschte genetische Information des zu exprimierenden Proteins enthält. Plasmide sind natürlich vorkommende DNA-Moleküle in Ringform, die zusätzlich zu den Chromosomen genetische Informationen in Bakterien tragen und auch reproduziert werden. Die Plasmide können zwischen einzelnen Bakterien ausgetauscht werden und dienen so z.B. zur Weitergabe von Antibiotikaresistenzen. Mit Hilfe dieser Genfähren können manipulierte oder künstlich synthetisierte Gene in geeignete Wirtszellen eingebracht werden, wo sie reproduziert und schließlich auch transkribiert und translatiert werden. Auf diese Weise werden die entsprechenden Opsine, also die retinalfreien Apoproteine der Sensorrhodopsine produziert. Bei Zugabe von all-trans-Retinal entstehen dann in den Zellen die kompletten Retinalproteine. Anschliessend werden die Zellmembranen "geerntet" und die gewünschten Proteine aufgereinigt.

Da die Halobakterien unter normalen Umständen nur sehr geringe Mengen der Photosensoren (im Vergleich zu BR) exprimieren, werden die eingeschleusten Gene entsprechend manipuliert, um die Proteinausbeuten zu erhöhen. Eine sinnvolle Aufreinigung größerer Proteinmengen im Milligrammbereich, wie sie für spektroskopische Messungen nötig sind, ist sonst nicht möglich. Es handelt sich hierbei vor allem um drei wesentliche genetische Veränderungen:

1. **Promotoraustausch:** Die Promotorstellen der Sensoropsin-Gene werden durch die entsprechende Sequenz aus dem Bakterioopsin-Promotor ersetzt. Die Promotorsequenz reguliert die Expression des Gens. Der Austausch durch den BR-Promotor führt daher zu einer vermehrten Proteinsynthese. Außerdem kann im weiteren durch den Mechanismus der homologen Rekombination in der Zelle das Bakterioopsin-Gen durch das künstlich eingeschleuste Gen ersetzt werden [23].
2. **Kappen der letzten 42 Basenpaare:** Von den Genen der Sensorrhodopsine aus *H. salinarum* werden die letzten 42 Basenpaare abgeschnitten. *H. salinarum* reagiert auf diese Veränderung mit einer Erhöhung der Produktion der entsprechenden Proteine um ca. das Zehnfache [23].
3. **Histidin-Tag:** Am 3'-Ende der Gensequenzen wird eine zusätzliche Sequenz angehängt, die eine Poly-Histidin-Kette codiert. Der dadurch bei der Proteinsynthese am C-Terminus entstehende "Histidinschwanz" ermöglicht eine verbesserte Aufreinigung des Proteins.

Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend durch Zugabe eines Detergenz (Dodecyl-Maltosid) solubilisiert. Durch die Zugabe des Detergenz wird erreicht, dass die einzelnen Proteinmoleküle sich nicht spontan zu kleineren Membranfragmenten zusammenlagern, sondern eine homogene Lösung entsteht. Die nächsten zwei Abschnitte gehen noch etwas detaillierter auf die Herstellung und die Eigenschaften der einzelnen Proben ein.

2.6.1 Sensorrhodopsin II aus *N. pharaonis* (pSRII)

Die pSRII-Probe wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund hergestellt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in [39]. Die Expression der Gene findet im Fall von pSRII nicht in Halobakterien, sondern in Eubakterien vom Typ *Escherichia coli* statt. Die mutierten Gene tragen am 3'-Ende eine Sequenz aus sieben Histidinen.

In [39] wurde auch untersucht, ob zusätzliche Histidin-Sequenzen den Photozyklus von pSRII und von BR beeinflussen. Diese Messungen wurden mit rekonstituierten Membranen der mutierten und der native Proteine durchgeführt. Im Falle von pSRII konnte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Photozyklus des unmutierten Proteins auf der Mikrosekunden- bis Sekunden-Zeitskala beobachtet werden. Lediglich im Millisekunden-Zeitbereich des BR-Photozyklus wurden wesentliche Änderungen entdeckt, die eventuell auf die zusätzlichen Histidine zurückzuführen sind. Für die Primärreaktion sollten die Veränderungen gegenüber dem Wildtyp aber bei beiden Retinalproteinen keine Rolle spielen, zumal die zusätzlichen Aminosäuren an der cytoplasmatischen Seite des Proteins weit entfernt von der Bindungstasche lokalisiert sind.

Mit der durch die Mutation verbesserten Aufreinigungsprozedur wurde eine Proteinausbeute von bis zu 1 mg pro Liter Zellkultur bei einer Reinheit von > 95% (Gewichtsprozent) erreicht [59]. Die Probe befand sich am Ende des Herstellungsprozesses in einer 10 mM Lösung des Puffers Tris-HCl bei pH 8,0 mit einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl und einer Detergenzkonzentration von 0,2% Dodecyl-Maltosid.

2.6.2 Sensorrhodopsin I und II aus *H. salinarum* (sSRI, sSRII)

Die Sensorrhodopsinproben sSRI und sSRII wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hergestellt.

Die Gene (sopI und sopII) wurden wie oben beschrieben mutiert und über Plasmidvektoren mit der Bezeichnung pBPH-M in *H. salinarum* eingeschleust. Die Konstruktion des Vektors ist in [70] beschrieben. Nach der Expressierung der homolog rekombinierten Gene wurden die Membranen geerntet und die Proteine aufgereinigt. Details dazu finden sich in [53].

Beide Proben befanden sich am Ende des Herstellungsprozesses in einer 50 mM MES-Pufferlösung bei pH 6,0 bei einer Salzkonzentration von 4M NaCl. Die Konzentration des Detergenziums (Dodecyl-Maltosid) betrug 0,025% im Fall von sSRI und 0,05% bei sSRII. Der pH-Wert von 6,0 der SRI-Probe stellt sicher, dass das Protein überwiegend in der blauen Form vorliegt (siehe Abschnitt 2.4), in der es als Photosensor funktioniert.

2.6.3 Bakteriorhodopsin aus *H. salinarum*

Das verwendete BR stammte ebenfalls vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Es befand sich in 10mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 8. (Detailliertere Informationen in [88, 45].)

3 Primärreaktion der Retinalproteine

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ermöglichen erstmalig einen Einblick in die Primärreaktion der Sensorrhodopsine. Während die späteren Intermediate im Photozyklus dieser Proteine bereits relativ gut charakterisiert sind, ist die Kinetik der Primärschritte von SRI und SRII bisher weitgehend unbekannt. Für die Ionenpumpen BR und HR, sowie für das nah verwandte "Sehprotein" Rhodopsin und für freies Retinal in Lösung wurden dagegen in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Ultrakurzzeitmessungen durchgeführt und theoretische Modelle zur Primärreaktion entwickelt. In diesem Kapitel sollen einige dieser Modellvorstellungen zusammengefasst werden, ohne jedoch den Stand der Forschung vollständig wiederzugeben. Nachdem die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messung nicht mit der allerhöchsten, bisher nur in Einzelkanalmessungen erreichten Zeitauflösung durchgeführt wurden, liegt der Schwerpunkt bei der Beschreibung der Primärreaktion weniger auf der extrem schnellen Wellenpaketsdynamik, sondern eher bei der folgenden Rückreaktion vom angeregten S_1 -Zustand in den elektronischen Grundzustand.

3.1 Ein eindimensionales Modell der Primärreaktion von BR

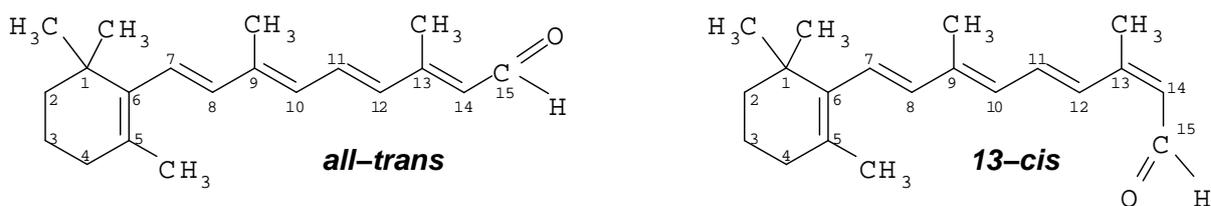


Abbildung 3.1: Das Retinalmolekül in den Konformationen *all-trans* (links) und *13-cis* (rechts)

Erste Anreg-Abtastmessungen an BR zeigten, dass aus dem elektronisch angeregten Zustand des Retinals bereits innerhalb der ersten Pikosekunde nach der Lichtanregung das Grundzustandsintermediat J gebildet wird [73, 67, 86], das wiederum in ca. 5 ps

3 Primärreaktion der Retinalproteine

in das Intermediat K zerfällt. Schon innerhalb des ersten Reaktionsschrittes, der Bildung von J, erfolgt auch die Isomerisation des Retinalmoleküls von der ursprünglichen *all-trans*-Konfiguration in die 13-*cis*-Konfiguration (siehe Abb. 3.1). Die in der transienten Absorption beobachtete Zeitkonstante für den S_1 -Zerfall liegt laut Nuss et al. [67] bei 430 ± 50 fs. Wenig später wurden diese Beobachtungen von weiteren Ultrakurzzeitmessungen bestätigt [63, 18], die eine Zeitkonstante von 500 fs angaben. Ausserdem kann in diesen Messungen eine weitere, schnellere Kinetik (100-200 fs) beobachtet werden, die einer ersten Reaktion des Retinals auf der S_1 -Potentialfläche weg von der Franck-Condon(FC)-Region in Richtung des Energieminimums zugeschrieben wurde. Als mögliche Interpretation dieser Reaktion wurde eine teilweise Isomerisierung des Retinals (Drehung um die Doppelbindung $C_{13}=C_{14}$) diskutiert. Von dieser bereits etwas gedrehten Konformation aus, kann das Molekül dann beim Übergang in den Grundzustand sowohl, die *cis*- als auch die *all-trans*-Konformation erreichen (siehe Abb. 3.2), wenn das Minimum der S_1 -Fläche über dem Maximum der Grundzustandsfläche (Energiebarriere zwischen *cis* und *trans*) angenommen wird. Die Quantenausbeute hängt damit von der genauen Form der Potenzialflächen ab.

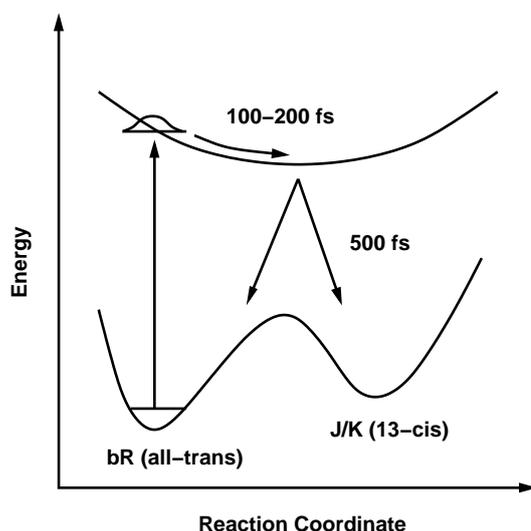


Abbildung 3.2: Eindimensionales Modell der Primärreaktion von BR nach [63, 18]

Die erste Bestimmung der 3D-Struktur von BR [36] lieferte wenig später den Ausgangspunkt für theoretische Simulationen der Primärreaktion in BR. Die von Warshel et al. [101] simulierte Reaktion entspricht einer stark gedämpften Bewegung des Wellenpaketes im angeregten Zustand, wobei das Minimum der S_1 -Fläche nach ca. 200 fs erreicht ist. Die Bewegung spiegelt sich auch hier vor allem in einer Änderung des 13-14-Torsionswinkels wieder, d.h. das Retinal isomerisiert bereits in den ersten 200 fs teilweise. In stark vereinfachenden Molekulardynamiksimulationen [44] wurde auch der Übergang in den Grundzustand modelliert, wobei sich ebenfalls eine sofort einsetzende teilweise Isomerisierung des Retinals und eine vollständige Isomerisierung in 500 fs ergibt. Bei allen diesen Simulationen bestehen allerdings große Unsicherheiten in Bezug auf die angenommene Form

der Potentialflächen, von denen die Dynamik der Reaktion empfindlich abhängt. Weitere Unsicherheiten in Bezug auf die genaue Lage des Chromophors und der beteiligten Wassermoleküle führten dazu, dass diese ersten Simulationen mehr Fragen aufwarfen, als sie Antworten lieferten [44].

Eine weitere Herausforderung stellte die Aufklärung der Natur des ersten Grundzustandsintermediats J dar. Zeitaufgelöste Resonanz-Raman-Messungen ergaben Hinweise, dass es sich dabei um eine schwingungsangeregte, "heiße" Form des K-Intermediats handelt, bei der der Chromophor noch nicht vollständig in die *all-trans*-Konfiguration relaxiert ist [19, 4]. Da bei diesen Messungen jedoch die Trennung zwischen den Spektren des nach der Rückreaktion ebenfalls schwingungsangeregten Grundzustands¹ BR₅₇₀ und des J-Intermediats recht schwierig ist [19], steht diese Interpretation auf etwas schwachen Füßen.

Die schnelle Isomerisation des Retinals ist in diesem Modell nur möglich, wenn die S₁-Fläche im Bereich der FC-Region sehr steil verläuft. Dies steht im Gegensatz zur Form des Potentials in freiem Retinal, wo aus Symmetriegründen die Steigung an diesem Punkt verschwindet. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass im Fall von BR nicht nur die Quantenausbeute sondern auch die Form der Potentialflächen stark durch die Proteinumgebung des Chromophors beeinflusst werden. Eine Konsequenz aus einer steilen S₁-Fläche ist jedoch, dass sich innerhalb der ersten 100-200 fs das Emissionsspektrum stark rotverschieben sollte, da sich der Abstand zur Grundzustandsfläche verringert. Dies steht jedoch im Widerspruch zu experimentellen Beobachtungen der Emissionsspektren, die keine wesentlichen spektralen Änderungen der Emission im Verlauf der Primärreaktion zeigen [35, 32]. Insbesondere konnte auch kein verzögertes Einsetzen der Emission bei Messungen im Wellenlängenbereich zwischen 700 nm und 900 nm beobachtet werden [18, 20]. Auch in neueren Messungen mit höchster Zeitauflösung wurden allenfalls kleine Verzögerungen des Einsetzens der stimulierten Emission von bis zu 40 fs bei sehr kurzweiliger Anregung (530 nm) gefunden [45]. Ebenfalls sollte sich durch das schnelle Herunterlaufen des Systems auf der S₁-Fläche der Abstand zu höheren elektronischen Zuständen vergrößern und somit die Absorption des S₁ während der ersten 100-200 fs zu kürzeren Wellenlängen schieben. Eine mit 100-200 fs einsetzende Absorption bzw. eine Blauverschiebung bei kurzen Abtastwellenlängen konnten von Ye et al. [113] nicht beobachtet werden. In den frühesten Kurzzeitmessungen von Mathies et al. [63] kann jedoch eindeutig eine Blauverschiebung der Excited-state-Absorption innerhalb der ersten 100 fs beobachtet werden.

Anfinrud und Mitarbeiter schlugen ein alternatives eindimensionales Drei-Zustandsmodell vor, welches das zeitlich unveränderte Spektrum der stimulierten Emission durch Einführung einer kleinen Energiebarriere im S₁-Zustand erklärte [35, 26]. Auch dieses Modell konnte aber nicht alle experimentellen Beobachtungen erklären und soll hier nicht weiter ausgeführt werden. Eine genauere Diskussion findet sich in [45].

¹Die Besetzung von Schwingungszuständen des elektronischen Grundzustands erfolgt durch die 36% der Moleküle, die nach der Anregung nicht in die *all-trans*-Konformation isomerisieren.

Alle vorgeschlagenen eindimensionalen Modelle gehen davon aus, dass bereits die schnellsten Anteile der beobachteten Dynamik mit der beginnenden Isomerisierung des Retinals zusammenhängen. Keines dieser Modelle ist jedoch in der Lage, die Gesamtheit der vielfältigen experimentellen Beobachtungen der Primärreaktion von BR zu erklären. Es scheint auch nicht allzu erstaunlich, dass ein komplexes System aus Retinal und Proteinumgebung nur unter Berücksichtigung mehrerer Reaktionskoordinaten genau beschrieben werden kann.

3.2 Mehrdimensionale Modelle der Retinalisomerisierung

Ein realistisches Modell der Primärreaktion sollte unter anderem die Frage klären, welche Rolle die Isomerisierung des Retinals spielt und welche der beobachteten Kinetiken mit der Isomerisierungsreaktion verknüpft sind. Zur gezielten Untersuchung dieser Fragen wurden mehrere Untersuchungen mit modifizierten Pigmenten durchgeführt, bei denen die Isomerisierung um die 13-14-Bindung durch eine zusätzliche C_2H_4 -Brücke zwischen den Atomen C_{12} und C_{14} verhindert wird [16, 1, 113]. Diese Messungen zeigen, dass bei den modifizierten Proteinen das Intermediat K nicht erreicht wird, sondern statt dessen eine Rückreaktion in den Grundzustand erfolgt. In den ersten 200 fs unterscheidet sich jedoch die Dynamik der modifizierten Proben kaum von den Proben mit gewöhnlichem Retinal. Diese Beobachtung legt die Schlussfolgerung nahe, dass diese erste ultraschnelle Reaktion des Retinals auf die Anregung nicht, wie in den eindimensionalen Modellen angenommen, mit der Isomerisierung korreliert ist. Notwendigerweise müssen also andere Reaktionskoordinaten wesentlich beteiligt sein [113].

In diesem Zusammenhang von Interesse sind quantenchemische Rechnungen zur 11-*cis*-Isomerisierung von Retinal von Garavelli et al. [28, 29]. Diese Rechnungen wurden an der protonierten Schiffischen Base des 11-*cis*-Retinals (PSB11), wie sie im Sehprotein Rhodopsin vorkommt, durchgeführt. In Abb. 3.3 ist ein Ausschnitt der S_1 -Fläche schematisch dargestellt. Nach der Lichtanregung startet das System zunächst in der Franck-Condon-Region (FC) und relaxiert in Richtung einer sehr flachen Region in der Nähe eines Sattelpunktes (SP), bevor die eigentliche Torsionsbewegung startet. Im Zuge der Rotation um die C=C-Doppelbindung wird in diesen Rechnungen im weiteren Verlauf der Reaktion eine konische Durchschneidung mit der Grundzustandsfläche erreicht, so dass eine effiziente Relaxation in den S_0 -Zustand stattfinden kann.

Freies Retinal in Lösung zeigt in Femtosekunden-Absorptionsmessungen ebenfalls eine schnelle Komponente innerhalb der ersten 100 fs [31]. Der Zerfall des angeregten Zustands läuft jedoch mit einer biexponentiellen Kinetik auf der Pikosekunden-Zeitskala ab. Im Falle des Proteins Rhodopsin dagegen ist die Primärreaktion bedeutend schneller und ist im wesentlichen bereits nach etwa 200 fs abgeschlossen [100]. Nach den Ergebnissen von Garavelli et al. kann die Reaktion des freien Retinals so interpretiert werden:

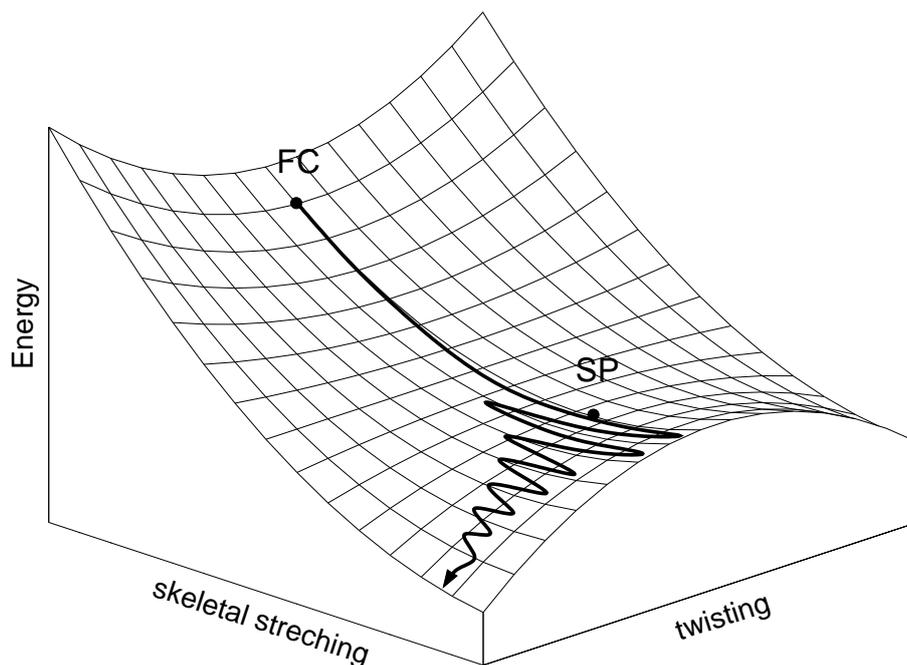


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der S_1 -Potentialfläche von PSB11 mit MEP (minimum energy path) für die 11-*cis*→*trans*-Isomerisierungsreaktion nach [29, 28]. FC: Franck-Condon-Punkt, SP: Sattelpunkt.

Die schnellste Komponente (~ 100) entspricht einer Bewegung längs einer Reaktionskoordinate, die der Streckung der C=C-Doppelbindung entspricht. Durch die Streckung der Bindung gelangt das Retinal in den sehr flachen Bereich der Potenzialfläche, von wo aus die Torsionsbewegung (Isomerisierung) wegen der geringen Steigung nur sehr langsam einsetzt. Daher beobachtet man eine Rückreaktion in den Grundzustand erst nach einigen Pikosekunden. Durch die Proteinumgebung des Retinals in Rhodopsin könnte die Energiefläche so deformiert werden, dass die Steigung in Richtung der Torsionskoordinate erheblich steiler wird und damit der Prozess erheblich beschleunigt würde.

Sehr schnelle Dynamiken mit Zerfallszeiten im Bereich bis 200 fs wurden nicht nur in freiem Retinal und BR, sondern auch in der Chloridionenpumpe HR und in Mutanten von BR, die an der Position 85 eine ungeladene Aminosäure (statt Asp85) tragen [2, 115, 88], beobachtet. Der Übersichtlichkeit halber sind die hier diskutierten, in transienten Absorptionmessungen beobachteten Zeitkonstanten der verschiedenen Retinalproteine bzw. von freiem Retinal in Tabelle 3.1 zusammengestellt. Beim Vergleich der Literaturdaten ist zu beachten, dass die Geschwindigkeit dieser schnellsten Kinetiken oft an der Grenze der Zeitauflösung der verwendeten Apparaturen lagen, bzw. bei besserer Zeitauflösung deutliche oszillatorische (nichtexponentielle) Anteile in diesem Zeitbereich sichtbar werden. Zudem zeigen neueste in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Experi-

3 Primärreaktion der Retinalproteine

mente mit höchster Zeitauflösung, dass die transiente Absorption bis etwa 200 fs auch nicht unwesentlich von der Anregungswellenlänge abhängt [88].

Probe	Beobachtete Kinetiken [ps]			Referenz
	$S_1^* \rightarrow S_1$	$S_1 \rightarrow S_0$	S_0 (J→K)	
BR	0,1-0,2	0,5	3-5	[63, 18, 45]
BRD85T	0,15	3 / 18		[115, 88]
HR	0,1-0,2	1,5 / 8		[2, 88]
PSB	0,1 / 0,3	2 / 7,2		[31]
Rhodopsin		0,2		[49]

Tabelle 3.1: In der transienten Absorption von Retinalproteinen, Rhodopsin und PSB beobachtete Kinetiken (Auszug aus Literaturdaten). Diskussion siehe Text.

Insgesamt ergibt sich der Eindruck, dass die dem S_1 -Zerfall vorausgehende Dynamik nur schwach von der Proteinumgebung abhängig ist, während die Reaktionszeit für den $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang stark durch die umliegenden Seitenketten des Proteins beeinflusst wird. Durch die bereits erwähnten Messungen an den BR-Proben mit modifizierten Pigmenten wird diese Interpretation besonders unterstützt, da selbst bei einer kompletten Blockade des Reaktionsweges in das K-Intermediat in den ersten 200 fs praktisch kaum Änderungen beobachtet wurden.

Der Einfluss der Proteinumgebung auf das Retinal kann entweder durch sterische oder durch elektrostatische Wechselwirkungen zustandekommen. Eine dramatische Verlangsamung der $S_1 \rightarrow S_0$ -Reaktion wird in BR beobachtet, wenn die (bei normalem pH-Wert) deprotonierte, d. h. negativ geladene Aminosäure Asp85 durch eine ungeladene Aminosäure (z. B. Threonin oder Asparagin) ersetzt wird (siehe Tab. 3.1 und [55, 88]). Auch bei HR, das ebenfalls einen langsamen, biexponentiellen S_1 -Zerfall zeigt, befindet sich an der entsprechenden Position ein Threonin. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass elektrostatische Wechselwirkungen, insbesondere mit dem Gegenion der Schiffchen Base einen wichtige Rolle bei der Primärreaktion spielen.

Neuere CASSCF/MRCI-Rechnungen an protonierten Retinal-Schiff-Base-Modellen kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Retinalisomerisierung wesentlich durch elektrostatische Einflüsse des Proteins beschleunigt wird [66]. In diesen Rechnungen konnte eine Durchschneidung der S_1 - und S_0 -Flächen und damit eine schnelle Rückreaktion nur durch die Einführung eines Gegenions erreicht werden. Außerdem zeigte sich auch hier, dass zunächst eine Relaxation von Bindungslängen im angeregten Zustand notwendig ist, bevor eine barrierelose Isomerisation stattfinden kann. Diese Ergebnisse werden in Kapitel 8 noch genauer diskutiert.

3.3 Besonderheiten der Sensorrhodopsine

Unter den wenigen Hinweisen auf den Charakter der Primärreaktion der Sensorrhodopsine sind für diese Arbeit vor allem die ersten Messergebnisse der Quantenausbeuten für die Bildung der Intermediate der Photozyklen von Bedeutung. Für pSRII wurde von Losi et al. [57] in Blitzlicht-Photolyse-Messungen und optoakustischer Spektroskopie eine Quantenausbeute von $0,5 \pm 0,06$ für die Bildung des K-Intermediates (K_{510}) bestimmt, wobei sich das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete pSRII mit His-Tag (siehe 2.6) und der Wildtyp nicht signifikant unterscheiden.

Die Quantenausbeute für sSRI wurde mit der gleichen Methode auf $0,4 \pm 0,05$ bestimmt [56]. Außerdem wurde bei diesen Messungen auch die Mutante SRI-D76N untersucht, bei der die Aminosäure Asp76, die ähnlich wie Asp85 in BR als Protonenakzeptor und Gegenion wirkt, durch eine nichtprotonierbare Aminosäure (Aspartat) ersetzt ist. Deutliche Unterschiede beim Zerfall des Intermediates SRI_{610} (siehe Abschnitt 2.4) bei der Mutante gegenüber dem Wildtyp führen die Autoren auf sterische Beschränkungen des Chromophores durch eine rigidere Bindungstasche des Proteins zurück. Während bei dem eingestellten pH-Wert von 6,0 Asp76 ohnehin in protonierter Form vorliegt und daher durch die Mutation die Ladungsverteilung kaum verändert werden dürfte, könnte dagegen in einer sehr engen Bindungstasche die Mutation zu großen Änderungen führen. Die Messungen liefern auch Hinweise, dass schon die Bildung von SRI_{610} , d.h. die Primärreaktion von SRI, bereits durch solche sterischen Faktoren beeinflusst werden könnte.

Hinweise auf sterische Wechselwirkungen zwischen der SRI-Bindungstasche und dem Retinal nahe der 13-Methylgruppe des Chromophors wurden bei Absorptionmessungen an SRI-Proben mit verschiedenen Retinalanaloga gefunden [108]. Weitere Indizien für sterische Behinderungen ergibt sich aus der Beobachtung, dass im Gegensatz zum K-Intermediat von BR die Bildung von SRI_{610} bei sSRI bei tiefen Temperaturen praktisch vollständig zurückgeht [111]. Die Isomerisierungsreaktion des Retinals in sSRI könnte daher mit der Überwindung einer Energiebarriere verbunden sein. Das bereits erwähnte Strukturmodell von SRI [54] bestätigt ebenfalls diese Ergebnisse.

4 Fluoreszenzmessungen

4.1 Bestimmung der S_1 -Lebensdauern aus Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Nach der Anregung des Moleküls in den ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 durch Absorption eines Photons kann dieser Zustand durch verschiedene photophysikalische Prozesse, wie spontane Emission (Fluoreszenz), interne Konversion oder Inter-System-Crossing wieder verlassen werden.

Als natürliche Strahlungslebensdauer bezeichnet man die mittlere Lebensdauer des angeregten Zustandes, wenn man annimmt, dass die Rückkehr in den Grundzustand nur durch spontane Emission erfolgen kann. Diese Größe ergibt sich aus dem Einstein-Koeffizienten für die spontane Emission, der wiederum mit dem Einstein-Koeffizienten für die Absorption korreliert ist [21]. Für reale Moleküle in Lösung müssen gegenüber der herkömmlichen Ableitung, die von einem reinen Zwei-Niveau-System ausgeht, einige Korrekturen vorgenommen werden, um realistische Werte für die Strahlungslebensdauer zu erhalten.

Strickler und Berg gaben 1962 einen Ausdruck an, mit der die natürliche Strahlungslebensdauer τ_0 bzw. die zugehörige Rate k_0 unter gewissen Voraussetzungen als

$$k_0 = 1/\tau_0 = 2.880 \times 10^{-9} n^2 \langle \tilde{\nu}^{-3} \rangle_{Av}^{-1} (g_l/g_u) \int \varepsilon(\tilde{\nu}) d \ln \tilde{\nu} \quad (4.1)$$

geschrieben werden kann [93]. Hierbei ist n der Brechungsindex des Mediums, g_l und g_u sind die Multiplizitäten des oberen (upper) und unteren (lower) Zustands und $\varepsilon(\tilde{\nu})$ der molare Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit von der Frequenz in Wellenzahlen (d.h. das Absorptionsspektrum). Die Größe $\langle \tilde{\nu}^{-3} \rangle_{Av}^{-1}$ berechnet sich aus dem Fluoreszenzspektrum der Probe gemäß:

$$\langle \tilde{\nu}^{-3} \rangle_{Av}^{-1} = \frac{\int I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int \tilde{\nu}^{-3} I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}} \quad (4.2)$$

Dabei bezeichnet $\tilde{\nu}$ die Frequenz in Wellenzahlen und $I(\tilde{\nu})$ die spektrale Photonenzahldichte.

Die bereits erwähnten Konkurrenzprozesse führen zu einer Reduzierung der tatsächlichen

S_1 -Lebensdauer gegenüber der natürlichen Strahlungslebensdauer τ_0 .

$$\tau = \frac{1}{(k_0 + \sum_i k_i)} \quad (4.3)$$

Die Beziehung zwischen τ_0 und τ kann experimentell über eine Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten ermittelt werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute hängt von den Ratenkonstanten der verschiedenen Prozesse wie folgt ab:

$$\Phi_F = \frac{k_0}{(k_0 + \sum_i k_i)} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (4.4)$$

Strickler und Berg gingen bei ihrer Analyse von folgenden Überlegungen aus: Im Allgemeinen werden bei der Anregung der Moleküle auch Schwingungsniveaus des angeregten elektronischen Zustandes besetzt. Nach Abgabe der überschüssigen Schwingungsenergie erfolgt dann die Fluoreszenz vom Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustands in einen wiederum schwingungsangeregten elektronischen Grundzustand. Die Energieabgabe an das Lösungsmittel bewirkt eine Rotverschiebung des Fluoreszenzlichtes.

Bei der Herleitung der Lebensdauer werden deshalb die Schwingungssubzustände des Moleküls in Born-Oppenheimer-Näherung mit berücksichtigt. Außerdem wird das elektronische Übergangsdipolmoment in einer Potenzreihe um eine feste Position der Kernkoordinaten entwickelt und nur der Term nullter Ordnung berücksichtigt.

Im ganzen ergeben sich durch die Herleitung der Strickler-Berg-Formel drei wesentliche Einschränkungen für deren Gültigkeit:

- Es muss sich um einen starken, d.h. erlaubten elektronischen Übergang handeln.
- Das Übergangsdipolmoment darf nur schwach von den Kernkoordinaten abhängen, bzw. das Molekül verändert seine Konfiguration im angeregten Zustand sehr wenig.
- Die Fluoreszenz muss wirklich vom Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustands aus erfolgen.

Diese Voraussetzungen sind im Fall photoaktiver Moleküle teilweise verletzt. Bei einer schnellen, barrierelosen Relaxation in den elektronischen Grundzustand (wie sie für BR angenommen wird), muss man davon ausgehen, dass die Emission aus einem nichtstationären und schwingungsangeregten Zustand aus erfolgt. Trotzdem finden sich viele Beispiele, darunter auch BR, in denen auch für barrierelose Isomerisationsreaktionen gute Abschätzungen für die S_1 -Lebensdauern gewonnen werden können (siehe [50] und Referenzen darin). In dieser Arbeit wurde die Formel von Strickler und Berg ebenfalls verwendet, um eine Abschätzung der S_1 -Lebensdauern der untersuchten Retinalproteine zu gewinnen.

4.2 Experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzquantenausbeuten

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren der Retinalproteine stand zunächst ein kommerzielles Fluoreszenzspektrometer vom Typ Fluorolog-2 der Firma Spex/ISA zur Verfügung. Im Rahmen der Genauigkeit dieses Gerätes konnte jedoch keine Fluoreszenz der Bakteriorhodopsin-Probe beobachtet werden. Bei den Sensorrhodopsinen konnten Fluoreszenzsignale beobachtet werden, die aber teilweise nur wenig über der für eine Korrektur der Daten nötigen Intensität lagen. Da die Empfindlichkeit des eingebauten Photomultipliers im roten und nahinfraroten Spektralbereich stark abnimmt, verringert sich dort die Genauigkeit der Messung rapide.

Um die relativ schwache Fluoreszenz der Retinalproteine genauer bestimmen zu können und einen direkten Vergleich zu BR zu ermöglichen wurde daher eine empfindlichere Versuchsanordnung verwendet, die in der Lage ist, auch im nahen IR-Bereich einzelne Photonen zu detektieren (Abb. 4.1). Als Detektor dient eine hochempfindliche CCD-Kamera (siehe [34]), die auf einer Matrix von 330×1000 Pixeln das gesamte Fluoreszenzspektrum der Proben detektieren kann.

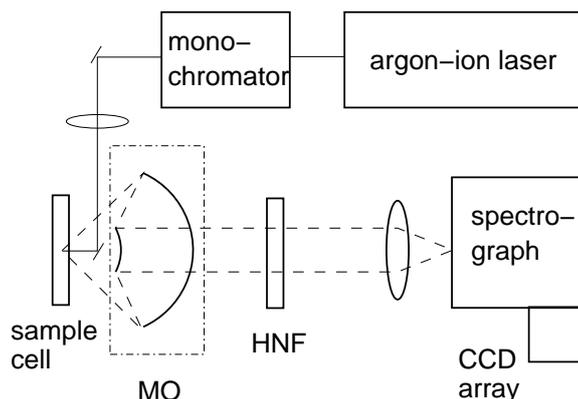


Abbildung 4.1: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der Fluoreszenzspektren. MO: Mikroskop-Objektiv, HNF: Holographisches Notch-Filter

Das Anregungslicht wurde von einem Argon-Ionen Laser geliefert, aus dessen Linienspektrum mit Hilfe eines einfachen Monochromators die Hauptlinie bei 514 nm ausgewählt wurde. Durch Einstellung einer sehr geringen Anregungsenergie von ca. 70 nW und durch kontinuierlichen Probenaustausch im Anregungsvolumen mit Hilfe eines Magnetrührers wurde sichergestellt, dass das Messsignal nicht durch Fluoreszenzbeiträge aus späteren Intermediaten der Photozyklen verfälscht wurde.

Das emittierte Fluoreszenzlicht wird in Rückwärtsrichtung mit Hilfe eines Mikroskopobjektivs aufgesammelt und dann auf den Eingangsspalt des Spektrometers fokussiert.

Ein holographisches Notch-Filter sorgt dafür, dass der größte Teil der in die Detektion gestreuten Anregungsphotonen abgeblockt wird.

Zur Bestimmung der absoluten Quantenausbeute wurde neben den Retinalproteinen außerdem Rhodamin 6G in Methanol als Referenzsubstanz gemessen. Die Fluoreszenzquantenausbeute dieses Farbstoffs wird z.B. in [69] zwischen 0,8 und 0,86 angegeben. In neueren Veröffentlichungen ([41] und Referenzen darin) findet sich ein Wert von 0,94. Für die im Folgenden durchgeführte Abschätzung der Lebensdauern wurde $\Phi_F = 0,94$ angenommen.

4.3 Ergebnisse

An den Fluoreszenzdaten, die mit der in Abbildung 4.1 gezeigten Messapparatur aufgenommen wurden, wurden folgende Korrekturen vorgenommen:

- Ein konstanter Untergrund (Streulicht) wurde von den Spektren abgezogen.
- Die Spektren wurden durch eine Korrekturfunktion dividiert, die den spektralen Verlauf der Empfindlichkeit der Detektionseinheit (Spektrometer und CCD-Kamera) wiedergibt. Um die Korrekturfunktion zu ermitteln, wurde das Spektrum einer Referenzlampe (Glühlampe) bei der jeweiligen Stellung des Spektrometers aufgenommen, und mit dem theoretischen Spektrum (Schwarzkörperstrahlung) verglichen. Die gewonnene Korrekturfunktion wurde außerdem anhand der vorhandenen Daten über die Gitterreflektivität und die Detektorempfindlichkeit überprüft. Zusätzlich wurde die Fluoreszenzmessung an BR mit einer veränderten Gittereinstellung durchgeführt und mit einer entsprechenden Korrekturfunktion multipliziert. Beide Spektren zeigen im Überlappungsbereich eine sehr gute Übereinstimmung (siehe Abb. 4.2).
- Die Intensität der Fluoreszenz wurde auf die Zahl der absorbierten Photonen des Anregungslichtes pro Zeiteinheit normiert. Eine Korrektur auf Reabsorption des Fluoreszenzlichtes erfolgte nicht, da die Absorption bei allen untersuchten Proben sehr gering gehalten wurde ($\approx 0.06 - 0.1$).

In Abbildung 4.2 und 4.3 sind die normierten, korrigierten Fluoreszenzspektren von Rhodamin 6G, BR, sSRI und pSRII zusammen mit ihren Absorptionsspektren aufgetragen. Um einen besseren Eindruck von der Spiegelbildlichkeit und der Rotverschiebung der Fluoreszenzbanden zu bekommen, wurden die Daten auf einer energielinearen Skala (Wellenzahlen) dargestellt. In Tabelle 4.1 sind außerdem die Positionen der Fluoreszenzmaxima, die Stokesverschiebungen und die aus dem Vergleich der Flächen unterhalb der Fluoreszenzbanden errechneten Quantenausbeuten der Proben eingetragen.

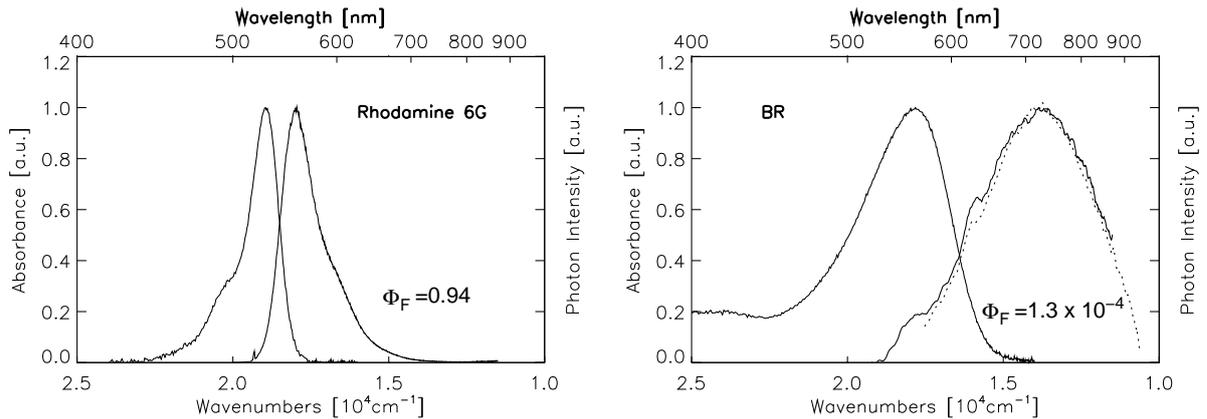


Abbildung 4.2: Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Rhodamin 6G (links) und Bakteriorhodopsin (rechts). Nach Variieren der Gitterposition im Monochromator ist das Ergebnis der Fluoreszenzmessung gut reproduzierbar (gepunktete Linie)

Im Fall von Bakteriorhodopsin ergibt sich eine Quantenausbeute von 1.3×10^{-4} . Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem Literaturwert aus [73] überein. Auf der linken Seite des Fluoreszenzspektrums erkennt man außerdem zwei kleinere Banden. Diese entsprechen zwei Raman-Banden von Wasser, die bei Stokesverschiebungen von 1640 und 3400 cm^{-1} ([84]) auftreten. Im Rahmen der Genauigkeit der Auswertung spielen diese hier aber keine Rolle.

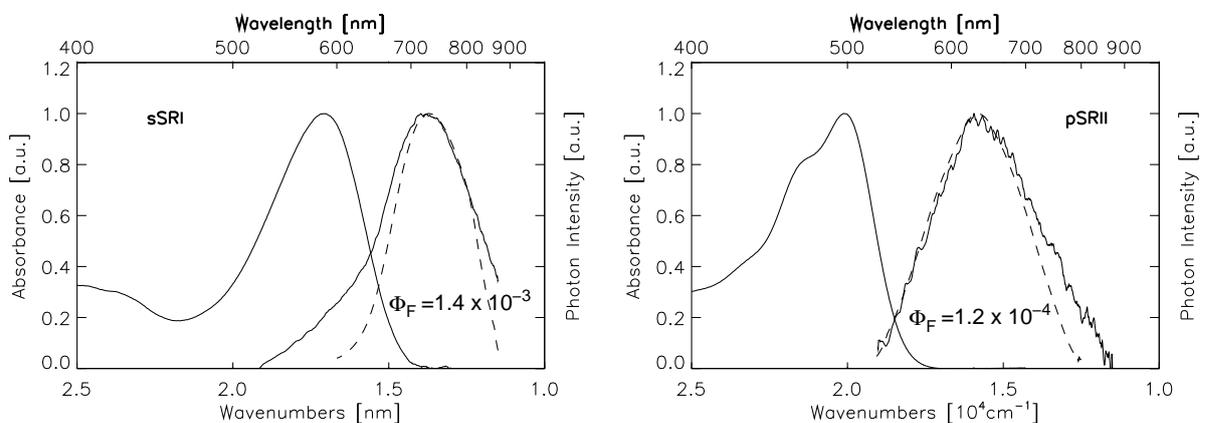


Abbildung 4.3: Normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren von sSRI (links) und pSRII (rechts). Die gestrichelten Linien entsprechen Vergleichsmessungen im Fluorolog-2 Spektrometer.

Die Fluoreszenzdaten von pSRII (Abb. 4.3 rechts) zeigen sowohl in der Form des Spektrums als auch in der Quantenausbeute große Ähnlichkeit mit BR. Der Stokes-Shift ist

im Vergleich zu BR um 580 cm^{-1} größer. Zum Vergleich ist in dieser Abbildung noch ein Fluoreszenzspektrum zu sehen, das mit dem Fluorolog-2 Spektrometer aufgenommen wurde (gestrichelte Linie). Man erkennt eine gute Übereinstimmung der normierten Spektren im kurzwelligen Bereich und einige Abweichungen im roten und infraroten Spektralbereich, die wahrscheinlich auf die bereits erwähnten Korrekturprobleme des kommerziellen Gerätes aufgrund mangelnder Detektorempfindlichkeit zurückzuführen sind.

Auch im Fall von sSRI erhält man ein breites, unstrukturiertes Fluoreszenzspektrum (Abb. 4.3 links). Allerdings liegt hier die Quantenausbeute um ca. eine Größenordnung über dem Wert von BR und pSR II und der Stokes-Shift ist etwas geringer. Die gestrichelte Linie zeigt wiederum eine Messung im kommerziellen Spektrometer. Allerdings ist der Unterschied in der Anregungswellenlänge bei diesen beiden Messungen enorm groß (514 nm bzw. 570 nm), so dass die kurzwellige Flanke der Fluoreszenzbanden nicht vergleichbar ist.

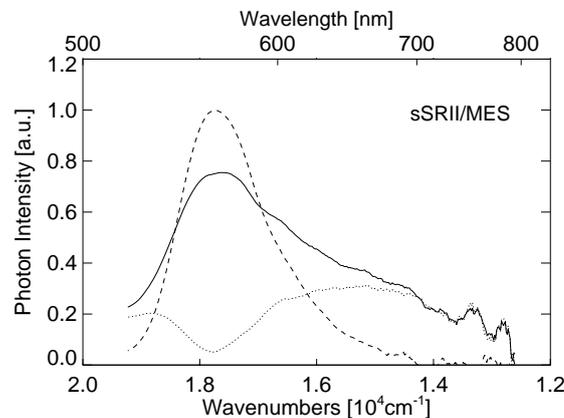


Abbildung 4.4: Fluoreszenzspektren von sSR II in MES (durchgezogene Linie) und reinem MES-Puffer (gestrichelte Linie) im Vergleich. Zieht man einen Anteil von 60% der Pufferkurve ab, erhält man einen Hinweis auf die Fluoreszenz von sSR II (gepunktete Linie).

Überraschenderweise unterschied sich das Fluoreszenzspektrum der sSR II-Probe völlig von dem pSR II-Spektrum. Die Stokesverschiebung war etwa um 830 cm^{-1} geringer, das Spektrum wesentlich schmaler und die Quantenausbeute ca. drei mal so hoch wie bei pSR II. Um das Fluoreszenzspektrum der sSR II-Probe genauer zu analysieren wurden daher weitere Messungen im herkömmlichen Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz der sSR II-Probe zum überwiegenden Teil von der Fluoreszenz der Pufferlösung herrührte. In Abb. 4.4 sind die aufgenommenen Spektren für die sSR II-Probe in MES-Puffer und reinen MES-Puffer bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm zum Vergleich dargestellt. Die Absorption der fluoreszierenden Bestandteile des Puffers ist so schwach, dass sie im Absorptionsspektrum des Puffers

nicht zu sehen ist. Aus der Abhängigkeit der Pufferfluoreszenz von der Anregungswellenlänge läßt sich aber schließen, dass die Absorption hauptsächlich im Bereich zwischen 500 nm und 550 nm erfolgt. Die Signale der Pufferlösung und des Proteins konnten aber mit den im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Daten nicht getrennt werden, so dass für den Wert der Quantenausbeute von sSRII nur eine viel zu hohe obere Schranke von 0,4% angegeben werden kann.

Auch in der kurzwelligen Flanke des Fluoreszenzspektrums von sSRI kann die Fluoreszenz des MES-Puffers beobachtet werden (Abb. 4.3). Da aber das Protein selbst im gleichen Spektralbereich wie die fluoreszierenden Bestandteile des Puffers absorbiert und sSRI viel stärker fluoresziert als sSRII, sieht man lediglich eine schwache Verformung (‘Fuß’) in der hochfrequenten Flanke der Fluoreszenzbande. Für die hier durchgeführte Auswertung der Ergebnisse wurde der Einfluss dieses Effektes nicht weiter berücksichtigt.

Die Absorptionsspektren der Proben wurden mit aus der Literatur entnommenen Wirkungsquerschnitten skaliert. Aus diesen skalierten Absorptionsspektren (siehe auch Abb. 6.2) und den korrigierten Fluoreszenzspektren wurden nach Gleichung 4.1 und 4.2 die Strahlungslebensdauern der Moleküle berechnet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 4.1.

		Rhodamin 6G	BR	sSRI	pSRII
$\lambda_{F,max}$	[nm]	556	700	710	625
ΔE_F	[cm ⁻¹]	954	3540	3010	4120
Φ_F		0.94	0.00013	0.0014	0.00012
τ_0	[ns]	4.54	6.34	6.16	5.99
τ	[ps]	4270	0.82	8.9	0.75

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Auswertung der Fluoreszenzspektren. $\lambda_{F,max}$: Intensitätsmaximum der Fluoreszenz, ΔE_F : Stokes-Shift, Φ_F : Fluoreszenzquantenausbeute, τ_0 : natürliche Strahlungslebensdauer, τ : S₁-Lebensdauer.

Die errechneten Lebensdauern für Rhodamin 6G stimmen relativ gut mit Vergleichswerten aus der Literatur überein. [7] gibt die natürliche Strahlungslebensdauer von Rhodamin 6G mit 3.9 ns an, während [41] die Fluoreszenzlebensdauer τ mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen zu 3.9 ns bestimmen, was bei einer Quantenausbeute von 94% einer natürlichen Strahlungslebensdauer von 4.15 ns entspricht.

Die Werte der errechneten natürlichen Strahlungslebensdauern der Retinalproteine liegen alle bei ca. 6 ns. Unterschiede in den Lebensdauern ihrer S₁-Zustände sind damit nach Gleichung 4.4 fast ausschließlich durch ihre verschiedenen Fluoreszenzquantenausbeuten bedingt. Während sich für BR und pSRII eine S₁-Lebensdauer von etwa 0,8 ps ergibt, liegt diese bei sSRI etwa um eine Größenordnung höher.

5 Erzeugung ultrakurzer, durchstimmbarer Lichtimpulse

5.1 Das Prinzip

Schnellste Vorgänge auf molekularer Ebene, die entscheidend für das detaillierte Verständnis chemischer Reaktionen sind, laufen bereits auf einer Zeitskala von nur wenigen Femtosekunden ab. Um auch in diesem ultraschnellen Zeitbereich Spektroskopie betreiben zu können, wurde die Pump-Probe-Spektroskopie entwickelt, bei der die erreichbare Zeitauflösung durch die Dauer der verwendeten Lichtimpulse gegeben ist. Die in der Probe durch einen Anregimpuls ausgelöste Photoreaktion wird dabei mit einem zeitlich verzögerten und schwächeren Abtastimpuls beobachtet. Durch Variation der Verzögerungszeit zwischen beiden Impulsen kann so die Transmissionsänderung der Probe als Funktion der Zeit beobachtet werden. Dabei ergeben sich folgende Anforderungen an das verwendete Lasersystem:

- Es müssen über einen weiten Wellenlängenbereich abstimmbare, kurze Anregimpulse zur Verfügung stehen, deren Pulsenergien in der Größenordnung von Nano- bis Mikrojoule liegen.
- Als Abtastlicht werden entweder spektral sehr einfach durchstimmbare Lichtimpulse (integrale Messung) oder aber spektral sehr breite, nicht durchstimmbare Lichtimpulse, die nach der Transmission durch die Probe spektral aufgespalten werden (dispergierte Messung), benötigt.

Lasersysteme, die stabile, intensive Femtosekundenimpulse erzeugen, sind jedoch in der Regel nicht oder nur mit großem Aufwand in der Wellenlänge abstimmbare. Es hat sich aber in den letzten Jahren gezeigt, dass mit nichtlinearen optischen Methoden in doppelbrechenden Kristallen durchstimmbare Frequenzkonversion ultrakurzer Lichtimpulse bei nur geringem Verlust der Stabilität möglich ist. Dabei werden intensive Lichtimpulse, die in der Regel in Ti:Saphir-Verstärkersystemen (regenerative Verstärker, Multipass) erzeugt werden, in sogenannten optisch parametrischen Verstärkern konvertiert. Bei geschickter Wahl der Phasenanpassungsbedingungen können die in solchen parametrischen

Verstärkern erzeugten Impulse auf Pulsdauern komprimiert werden, die weit unter der Dauer der Eingangsimpulse liegen.

Aufgrund dieser Ausgangssituation wurde die in dieser Arbeit verwendete Impulsquelle und der regenerative Verstärker so konzipiert, dass hohe Pulsenergien (ca. 1 mJ), hohe Pulsstabilität (Schwankungen $< 1\%$ der Pulsenergie) und stabiler Dauerbetrieb erreicht werden können. Die Dauer der nicht abgestimmten Impulse sollte bei etwa 100 fs liegen.

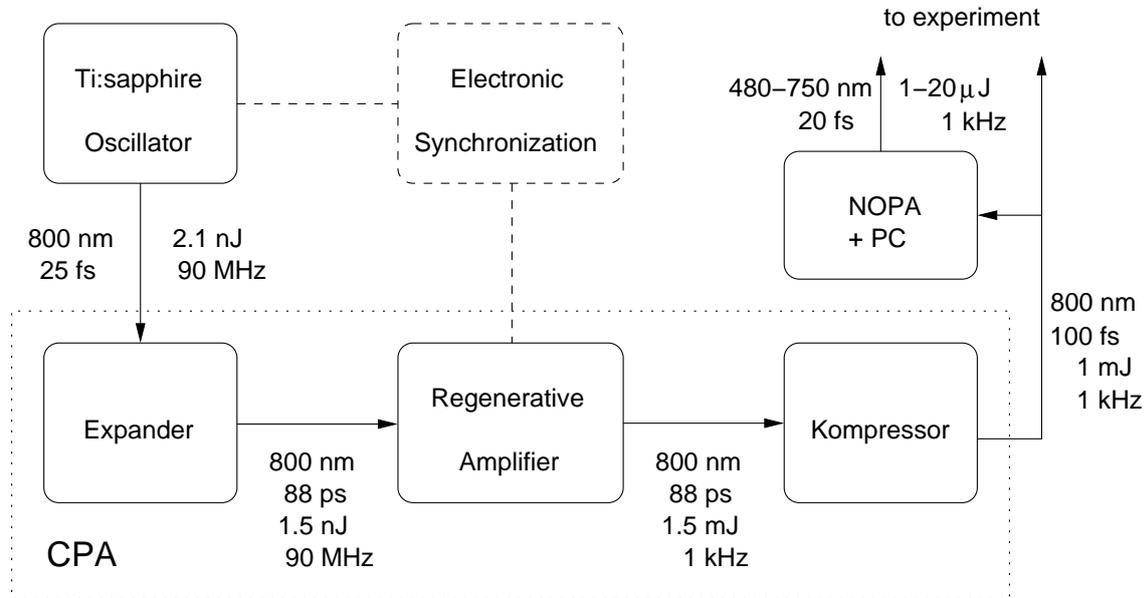


Abbildung 5.1: Prinzip der Erzeugung durchstimmbarer Femtosekundenlichtimpulse und Impulsparameter des beschriebenen Aufbaus.

Abb. 5.1 skizziert das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Erzeugung ultrakurzer, abstimmbarer Lichtimpulse. In einem modengekoppelten Ti:Saphir-Laser werden zunächst Lichtimpulse mit Zentralwellenlänge 800 nm und Impulsdauern von ca. 25 fs bei einer Wiederholrate von 90 MHz erzeugt. Anschliessend werden einzelne Impulse aus dem erzeugten Impulszug selektiert und in einem regenerativen Verstärker um ca. sechs Größenordnungen auf Impulsenergien von etwa 1 mJ verstärkt. Die Wiederholrate der verstärkten Impulse wird dabei durch die Repetitionsrate des Pumplasers bestimmt, der die zur Verstärkung notwendige Energie im Lasermedium des Verstärkers deponiert. Zur richtigen Auswahl der zu verstärkenden Impulse ist eine elektronische Synchronisation von Oszillator und Verstärker notwendig. Ein Teil der intensiven 800 nm-Pulse wird dann in einem nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärker (NOPA) zur Erzeugung abstimmbarer sichtbarer Lichtimpulse mit Pulsdauern von etwa 20 fs eingesetzt.

Im Folgenden sollen die einzelnen Komponenten der Femtosekundenlichtquelle detaillierter beschrieben werden.

5.2 Die Impulsquelle: der modengekoppelte Ti:Saphir-Laser

Zur Erzeugung kurzer Lichtimpulse in einem Laserresonator müssen vor allem drei Voraussetzungen erfüllt werden:

1. **Modenkopplung:** Es müssen über einen breiten Spektralbereich verschiedene Longitudinalmoden im Laserresonator so entstehen, dass sie eine definierte Phasenbeziehung zueinander haben.
2. **Intensitätsabhängiger Verlustmechanismus:** Der Laserresonator muss so konstruiert sein, dass die Verluste für hohe Intensitäten, wie sie während der Dauer eines kurzen Lichtimpulses auftreten, gering sind, während der Betrieb bei niedrigen Intensitäten (lange Impulse oder Dauerstrichbetrieb) verlustreich ist.
3. **Dispersionskontrolle:** Die durch optische Elemente und nichtlineare Prozesse im Resonator eingeführte Dispersion muss über einen weiten Frequenzbereich kompensiert werden, damit die feste Phasenbeziehung zwischen den gekoppelten Resonatormoden aufrecht erhalten werden kann.

Werden diese Voraussetzungen erfüllt, kann die Erzeugung kurzer Lichtimpulse praktisch von selbst starten oder durch eine geringe äußere Störung angestoßen werden.

Seit 1990 wurden zur Erzeugung ultrakurzer Lichtimpulse vorwiegend modengekoppelte Ti:Saphir-Laser verwendet [5]. Mit Titanionen dotierte Saphirkristalle zeichnen sich dabei durch ihre extrem große Verstärkungsbandbreite und durch hohe erreichbare Energiedichten (1 J/cm^2) aus.

Die Modenkopplung wird in Ti:Saphir-Lasern durch den longitudinalen Kerr-Effekt (Selbstphasenmodulation) und den transversalen Kerr-Effekt (Kerr-Linse) im Kristall erreicht. Durch den Kerr-Effekt senkrecht zur Strahlrichtung entsteht ein intensitätsabhängiger Verlustmechanismus, wenn der Resonator so angepasst wird, dass er mit ausgebildeter Kerr-Linse möglichst verlustfrei arbeitet, ohne Kerr-Linse dagegen schlecht. (Eine genauere Diskussion zum optischen Kerr-Effekt findet sich in [92].) Zur Dispersionskontrolle im Resonator kann ein herkömmlicher Prismenkompressor bestehend aus zwei Quarzprismen eingesetzt werden.

Mit verfeinerten Mitteln der Dispersionskontrolle wie gechirpten Laserspiegeln wurden mit Ti:Saphir-Lasern bereits Pulsdauern deutlich unter 10 fs erreicht [107, 94].

Der im Messaufbau verwendete Oszillator (Abbildung 5.2) orientiert sich im Design an den Anordnungen aus [3] und [102]. Es handelt sich um einen Vier-Spiegel-Resonator aus zwei ebenen Endspiegeln (MM und OC) und zwei Fokussierspiegeln (M2, M3) mit Radius 10 cm. Die Dispersion wird mittels zweier Brewsterprismen aus Quarz (P1, P2) kontrolliert. Mit Hilfe einer sehr schwach gekrümmten, konkaven Linse (L2), die senkrecht zur

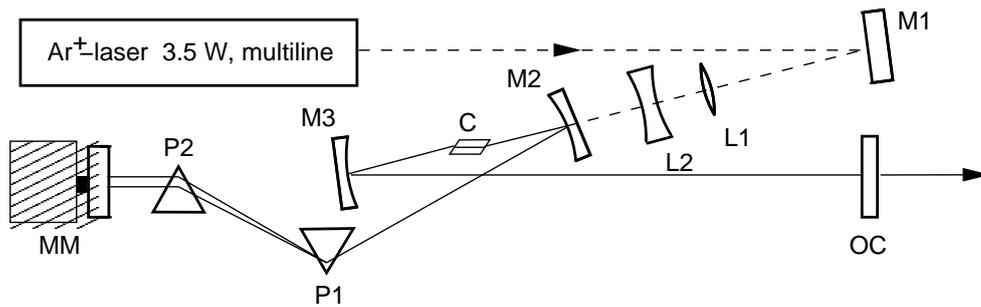


Abbildung 5.2: Schematischer Aufbau des modengekoppelten Ti:Saphir-Oszillators. M1: ebener Umlenkspiegel; M2, M3: Folussierspiegel; MM: beweglicher Spiegel, OC: Auskoppelspiegel; L1, L2: Einkoppellinsen; P1, P2: Quarzprismen.

Strahlausbreitungsrichtung verschoben werden kann, ist der Überlapp des gepumpten Kristallvolumens mit der Resonatormode optimal einstellbar.

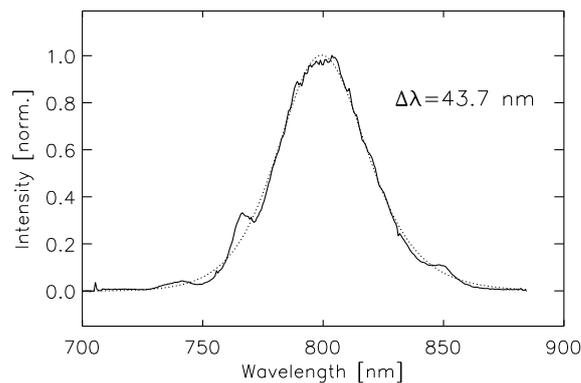


Abbildung 5.3: Typisches Spektrum des Ti:Saphir-Oszillators (durchgezogene Linie) Eine Anpassung unter der Annahme von sech^2 -förmigen Impulsen (gepunktete Linie) liefert eine spektrale Breite (FWHM) von 43.7 nm bzw. $2.05 \times 10^{13} \text{s}^{-1}$.

Da lediglich eine Dauer der verstärkten Laserimpulse von etwa 100 fs angestrebt war, wurden keine besonderen Anstrengungen unternommen, die Impulsdauer des Lasers weiter zu optimieren. Bei der Konstruktion standen vielmehr ein kompakter Aufbau, leichte Justierbarkeit, stabiler Betrieb und effiziente Ausnutzung der Pumpleistung im Vordergrund.

In Abbildung 5.3 ist das Spektrum des Oszillators im modengekoppelten Betrieb dargestellt, das um 800 nm zentriert ist. Nimmt man an, dass die Impulsform des Lasers einer

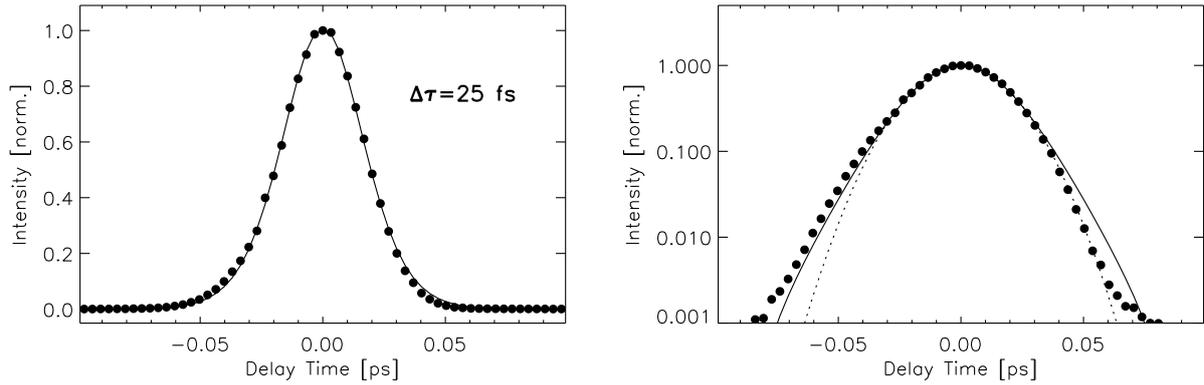


Abbildung 5.4: Typische Intensitätsautokorrelation der Impulse des Ti:Saphir-Oszillators in linearer (links) und einfach logarithmischer (rechts) Darstellung. Anpassung mit sech²-förmigen Impulsformen (durchgezogene Linie) liefert eine Impulsdauer (FWHM) von 25 fs. Unter der Annahme gaußförmiger Impulse erhält man eine Impulsdauer von 29 fs (gepunktete Linie).

sech²-Funktion entspricht, so sollte im Falle eines bandbreitebegrenzten Impulses auch das Spektrum sech²-förmig sein¹. Mit der Anpassung erhält man eine spektrale Breite von 43.7 nm (FWHM), was einer Frequenzbandbreite von $\Delta\nu = 2.05 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$ entspricht. Für sech²-förmige Impulse ergibt sich mit diesem Wert eine minimal erreichbare Impulsdauer von 15.4 fs.

In Abbildung 5.4 sind die Ergebnisse einer Autokorrelationsmessung an den Oszillatorimpulsen dargestellt. Bei dieser Messung wurde der ausgekoppelte Impuls vor Eintritt in den Autokorrelationsmessaufbau mit Hilfe eines externen Kompressors aus zwei Quarzprismen komprimiert. Die zu erkennende leichte Assymetrie der gemessenen Autokorrelationsfunktion ist auf kleine Fehler bei der Justage der Messanordnung zurückzuführen. Zur Bestimmung der Impulsbreite werden die Autokorrelationsdaten für den Fall sech²-förmiger Impulse mit einer Funktion angepasst, die der Faltung aus zwei identischen sech²-Funktionen entspricht (siehe [17], Tabelle 8.1). Die Impulsbreite ergibt sich zu 25.2 fs. Dies entspricht einem Zeit-Bandbreiteprodukt von 0.517 statt dem theoretisch möglichen Wert von 0.315 für bandbreitebegrenzte Impulse.

In Tabelle 5.1 sind nochmal alle wichtigen technischen Daten des Ti:Saphir-Oszillators zusammengefasst.

¹Dies ist strenggenommen nur korrekt, wenn das Spektrum gegen die Frequenz aufgetragen wird. Zur Anpassung des Spektrums in Abb. 5.3 muss die sech²-Funktion noch auf die Wellenlängenskala umtransformiert werden, was im hier vorliegenden Fall zu vernachlässigbar kleinen Änderungen führt.

Zentralwellenlänge	800 nm
spektrale Breite	46 nm
Impulsdauer	25 fs (extern komprimiert)
Pumpleistung	3.6 W
Ausgangsleistung	190 mW
Wiederholrate	90 MHz
Impulsenergie	2.1 nJ

Tabelle 5.1: Technische Daten des modengekoppelten Ti:Saphir-Lasers

5.3 Der CPA-Verstärker

Um mit den im Oszillator erzeugten ultrakurzen Lichtimpulsen effizient nichtlineare Optik betreiben zu können und so zu einer abstimmbaren Lichtquelle zu kommen, muss die Energie der einzelnen Pulse um etwa sechs Größenordnungen verstärkt werden. Dies geschieht in dem in diesem Abschnitt beschriebenen CPA-Verstärker. Ein Überblick über CPA-Systeme findet sich in [5].

Zunächst wird für die angestrebte Verstärkung ein Pumplaser benötigt, der die Energie im Lasermedium des Verstärkers deponiert. Pumplaser mit Impulsenergien im Millijoule-Bereich erreichen heute Repetitionsraten bis zu einigen Kiloherz. Das bedeutet, es muss pro Pumpimpuls ein Impuls aus dem Pulszug des fs-Oszillators ausgewählt werden, der dann das gepumpte Verstärkermedium einige Male durchläuft und die deponierte Energie abräumt.

Allerdings liegen die Zerstörschwellen der zur Impulsselektion und -verstärkung nötigen optischen Komponenten weit unterhalb der Energiedichten, die in einem Millijoule-Impuls mit 100 fs Dauer erreicht werden. Die bei der Verstärkung erreichten Lichtintensitäten würden außerdem zu nicht vernachlässigbaren und schlecht kontrollierbaren nichtlinearen Effekten wie Selbstphasenmodulation und Selbstfokussierung in den optischen Materialien des Verstärkers führen. Aus diesen Gründen wird der zu verstärkende Impuls vor dem Eintritt in den eigentlichen Verstärker durch künstlich eingeführte Dispersion gestreckt. In der hier beschriebenen Anordnung werden die Impulse so auf mehr als das 3000-fache ihrer ursprünglichen Länge expandiert, was zu einer entsprechenden Verringerung der Energiedichte führt. Die Pulsstreckung wird dabei über eine Gitteranordnung erreicht, in der die unterschiedlichen spektralen Anteile des Impulses unterschiedliche optische Weglängen zurücklegen. Die eingeführte Dispersion kann nach Abschluss des Verstärkungsprozesses in einer umgekehrten Anordnung (Kompressor) wieder rückgängig gemacht werden. Zusätzlich kann durch die Strecker-Kompressor-Kombination die Materialdispersion, die der Impuls beim Durchlauf durch den Verstärker erleidet, zumindest in zweiter Ordnung kompensiert werden.

5.3.1 Aufbau des Verstärkerresonators und der Pulseinkopplung

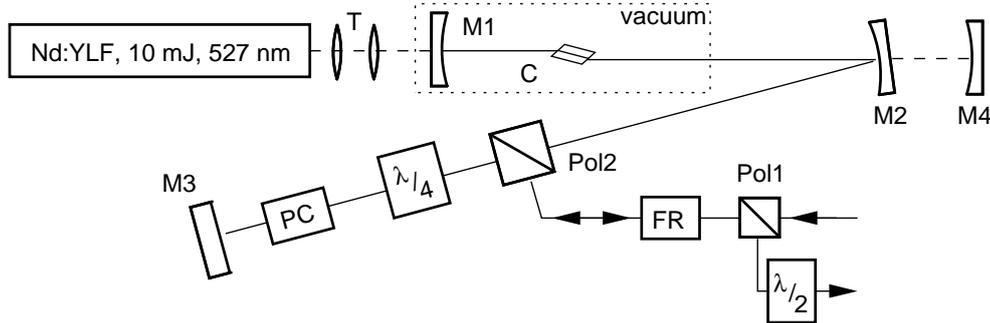


Abbildung 5.5: Schematischer Aufbau des regenerativen Verstärkers. T: Teleskop, M1: gekrümmter Endspiegel, C:Ti:Saphir-Kristall, M2: Fokussierspiegel, M3: Planer Endspiegel, M4: Retrospiegel, Pol1, Pol2: Polarisatoren, PC: Pockelszelle, FR: Faraday-Rotator

Abbildung 5.5 zeigt schematisch den Aufbau des Verstärkerresonators. Die im Expander gestreckten Lichtimpulse gelangen über einen Polarisator (Pol1) und den Faraday-Rotator (FR) in den Resonator. Diese Anordnung wirkt als “optische Diode”, die den einfallenden Lichtimpuls unverändert passieren lässt, während die Polarisation des aus dem Resonator zurückkehrenden, verstärkten Impulses im Faraday-Rotator um 90° gedreht wird, so dass dieser am Polarisator Pol1 reflektiert wird.

Über den Polarisator Pol2 werden die Lichtimpulse in den Verstärkerresonator eingekoppelt und durchlaufen auf dem Hinweg zum Endspiegel M3 und auf dem Rückweg zu Pol2 jeweils einmal die $\lambda/4$ -Platte und die Pockelszelle. In der Zeit zwischen zwei Verstärkungsvorgängen liegt keine Hochspannung an der Pockelszelle an und diese beeinflusst die Polarisation der Lichtimpulse nicht. Die Impulse treffen daher mit genau um 90° gedrehter Polarisation wieder auf den Polarisator Pol2 und durchlaufen den gesamten Verstärkerresonator einmal bevor sie nach erneuter Drehung um 90° ausgekoppelt werden. Da die Impulse pro Durchlauf durch den Verstärker bei maximaler Besetzungsinversion ca. um das 2 bis 3-fache verstärkt werden, bleibt die gespeicherte Energie im wesentlichen erhalten. Zum Synchronisationszeitpunkt wird dann eine Hochspannung an die Pockelszelle angelegt, wodurch diese wie eine $\lambda/4$ -Platte wirkt. Insgesamt ergibt sich jetzt pro Umlauf eine Polarisationsdrehung um 180° . Der momentan im Resonator befindliche Lichtimpuls wird “gefangen”. Nach 12-15 Umläufen wird die Pockelszelle wieder deaktiviert und der Lichtimpuls, der jetzt den größten Teil der Energie im Kristall abgeräumt hat, wird ausgekoppelt.

Da der umlaufende Impuls erst ausgekoppelt wird, wenn die Verstärkung die Sättigung erreicht, ist das Rauschverhalten der Ausgangsimpulse nur noch schwach von Schwankungen der Oszillatorpulse abhängig. Das Rauschen wird vor allem durch die Stabilität des Pumplasers bestimmt und liegt bei dem hier beschriebenen Lasersystem unter einem

Prozent der Impulsenergie.

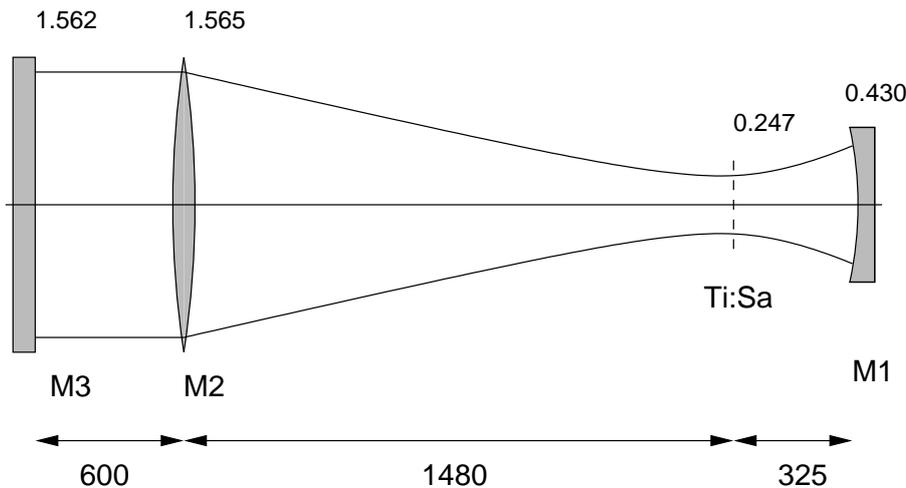


Abbildung 5.6: Berechnetes Strahlprofil im Verstärkerresonator. Angegeben sind die Modenradien (oben) und die Abstände der optischen Elemente (unten) in Millimetern. M1, M2, M3: wie in Abb. 5.5; Ti:Sa: Ti:Saphir-Kristall.

Bild 5.6 zeigt die Geometrie des Verstärkerresonators und den berechneten Modenverlauf. Die Rechnungen wurden mit einem ABCD-Matrixformalismus (Programm Paraxia) durchgeführt. Beim Design des Resonators standen folgende Gesichtspunkte im Vordergrund:

- Die Energiedichten im Bereich zwischen M2 und M3 sollten möglichst gering gehalten werden, da sich hier die empfindlichsten optischen Komponenten befinden (Pockelszelle, Polarisator, $\lambda/4$ -Platte). Dies kann nur durch einen großen Strahlquerschnitt erreicht werden.
- Der Modenradius am Kristallort muss möglichst klein sein, um eine gute Verstärkung zu gewährleisten.
- Der Strahlradius auf M1 darf nicht zu klein werden, da sonst die Zerstörschwelle des Spiegels erreicht wird. Gleichzeitig ist die Gesamtlänge des Resonators aber durch die Art der Pulseinkopplung und die Wiederholrate des Oszillators begrenzt.
- Das ausgekoppelte Licht sollte möglichst geringe Divergenz haben

Das in Abb. 5.6 gezeigte Resonatordesign konnte allen diesen Anforderungen gerecht werden. Der kritischste Punkt ist der Endspiegel M1, dessen Zerstörschwelle mit $> 5 \text{ GW/cm}^2$ (High-Power Laserspiegel, Fa. Laser Components, siehe [102]) angegeben werden kann. Im letzten Umlauf beträgt die maximale Pulsenergie etwa 1.5 mJ (im Kompressor geht ca. ein Drittel der Energie verloren) bei einer Pulsdauer von 88 ps (siehe

Tabelle 5.3). Das entspricht bei einem Radius von 0.43 mm einer Energiedichte von 2.9 GW/cm².

Um das Risiko der Zerstörung von M1 und von Beschädigungen der Oberflächen des Ti:Saphir-Kristalls zu verringern, befinden sich diese beiden Komponenten im Vakuum (siehe Abb. 5.5). Die Vakuumkammer bietet neben Staubvermeidung den Vorteil, dass der Kristall auf tiefere Temperaturen abgekühlt werden kann. Dadurch erhöht sich die Verstärkung pro Umlauf deutlich.

In den meisten regenerativen Verstärkern werden zum Ein- und Auskoppeln der Impulse in den Resonator Dünnschichtpolarisatoren verwendet. In dem hier beschriebenen Aufbau wurde jedoch ein auf größtmögliche Transmission optimierter Kalzitpolarisator mit Luftspalt verwendet. Damit muss man etwas größere Dispersionsanteile durch das Polarisatormedium in Kauf nehmen, die aber bei einer angestrebten Impulsdauer von 100 fs keine Rolle spielen. Auf der anderen Seite erhöht sich die ausgekoppelte Pulsenergie beträchtlich, da der Kalzitpolarisator im Gegensatz zum Dünnschichtpolarisator nahezu das gesamte Licht ($R > 97\%$) der richtigen Polarisationsrichtung reflektiert.

Eine weitere Besonderheit des beschriebenen Aufbaus ist der Retrospiegel (M4). Die vom Kristall nicht absorbierte Pumpenergie wird damit erneut in den Kristall zurückfokussiert. Dadurch wird ein gleichmäßigeres Pumpprofil und eine Einsparung von Pumpenergie erreicht.

Die wichtigsten technische Daten des Verstärkers sind nochmal in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Ausgangsenergie	1 mJ
Ausgangsimpulsdauer	100 fs
spektrale Breite	15 nm
Zentralwellenlänge	800 nm
Impulsenergieschwankungen	< 1% (RMS)
Pumpleistung	8-10 W
Repetitionsrate	1 kHz
Umläufe	12-15

Tabelle 5.2: Technische Daten des regenerativen Verstärkers.

5.3.2 Design von Expander und Kompressor

Zur definierten Streckung der Lichtpulse eines Verstärkersystems wurden bereits eine Vielzahl von optischen Anordnungen eingesetzt [5]. Die Einführung verschiedener optischer Weglängen für die einzelnen Spektralkomponenten des Impulses wird dabei meist durch vierfache Reflektion an einem oder doppelter Reflektion an zwei Gittern erreicht. Zur Erzeugung extrem kurzer verstärkter Lichtimpulse wurden aber auch bereits Anord-

nungen ohne Gitter benutzt, in denen die erforderliche Dispersion durch große optische Weglängen in hochdispersivem Material und durch Vielfachreflexion an geschirpten Laserspiegeln eingeführt wurde [79].

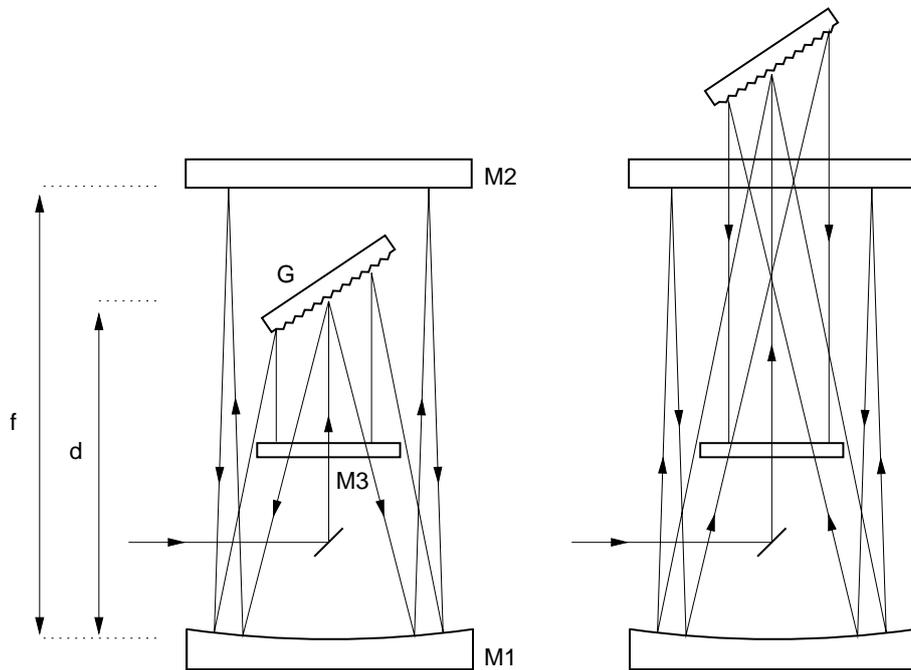


Abbildung 5.7: Schematischer Aufbau von Expander und Kompressor. M1: Fokussierspiegel, M2: ebener Faltungsspiegel, M3: ebener Retrospiegel, G: Gitter.

Im hier vorgestellten CPA-System wurde ein Design mit nur einem Gitter verwendet, bei der die Abbildung ausschließlich durch reflektive optische Komponenten realisiert ist. ähnliche Anordnungen wurden bereits in der Vergangenheit erfolgreich eingesetzt [114, 106, 102]. Bei Verwendung von nur einem Gitter werden Verzerrungen der Lichtimpulse durch Fehljustage der Gitter weitgehend ausgeschlossen. Die reflektive Optik ermöglicht darüberhinaus einen kompakten Aufbau und vermeidet chromatische Aberrationen.

Die verwendeten Anordnungen zur Streckung und Komprimierung der Lichtimpulse sind in Abbildung 5.7 zu sehen. Nach einer ersten Reflexion am Gitter gelangt das Licht in ein $2f$ -Teleskop bestehend aus einem sphärischen Spiegel (M1) mit Radius $R = 50$ cm und einem Faltungsspiegel (M2), der genau im Abstand der Brennweite von M1 plaziert ist. Nach Durchlaufen des Teleskops wird das Licht erneut am Gitter reflektiert und gelangt auf den Retrospiegel M3, von dem aus die gesamte Anordnung nochmal rückwärts durchlaufen wird. Die verschiedenen Elemente der Anordnung sind in der Höhe versetzt, damit der gezeichnete Strahlengang tatsächlich realisierbar ist. Durch Wahl des Abstandes zwischen Fokussierspiegel und Gitter (d) und die Feinjustage des Gitterwinkels können die Dispersionskomponenten zweiter und dritter Ordnung kontrolliert werden.

Mit der gezeigten Anordnung kann sowohl positive, als auch negative Dispersion zweiter

Ordnung eingeführt werden, je nachdem ob $d > f$ oder $d < f$ ist. Daher unterscheidet sich der Kompressor (Abbildung 5.7 rechts) vom Expander nur durch die veränderte Gitterposition.

Im folgenden soll die Dispersion zweiter Ordnung, die durch den verwendeten Strecker eingeführt wird, berechnet werden, um die Pulslänge der im Verstärker umlaufenden Pulse abschätzen zu können. Ersetzt man den sphärischen Fokussierspiegel in dem in 5.7 gezeigten Aufbau durch eine Linse mit gleicher Brennweite, kommt man zu einem Linsenstrecker (siehe Abbildung 5.8). Bis auf leichte Unterschiede, verursacht durch verschiedenartige Abbildungsfehler, sind beide Anordnungen äquivalent. Die Dispersion eines solchen Linsenstreckers kann aber leicht berechnet werden.

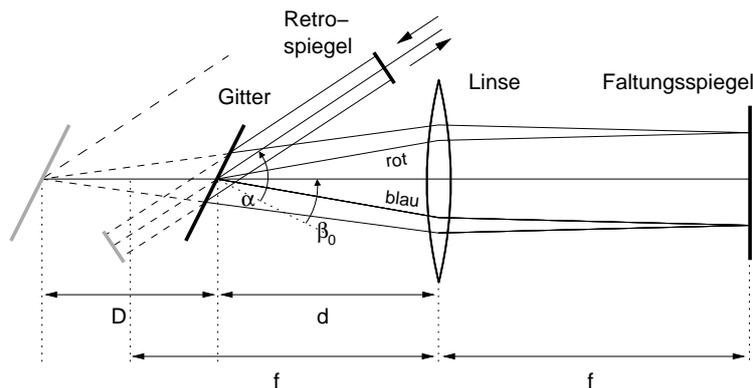


Abbildung 5.8: Berechnung der Dispersion eines Linsenstreckers: Die Gesamtweglängen für den Durchgang durch einen 2-Gitter-Kompressor (gestrichelt) und durch einen Linsenstrecker (durchgezogene Linien) sind für verschiedene Farben (blau, rot) gleich. Daher ist die Dispersion des Linsenstreckers der des einfachen Kompressors genau entgegengesetzt.

In Abbildung 5.8 erkennt man, dass die Dispersion eines Linsenstreckers der Dispersion eines einfachen 2-Gitter-Kompressors genau entgegengesetzt ist, wenn $D = 2(f - d)$ gilt. Die Dispersion eines herkömmlichen Gitterkompressors kann je nach Ansatz auf verschiedene Arten ausgedrückt werden [99, 60]. Ein einfacher und kompakter Ausdruck für die Dispersion zweiter Ordnung lautet:

$$D_2 = -2 \frac{D}{c} \frac{\lambda_0}{2\pi c} \left(\frac{\lambda_0 N}{\cos \beta_0} \right)^2 \quad (5.1)$$

Dabei ist λ_0 die Zentralwellenlänge der Lichtpulse, c die Lichtgeschwindigkeit und N die Gitterkonstante. β_0 , der Ausfallswinkel des zentralen Strahls nach der ersten Reflexion am Gitter, entspricht in der verwendeten Littrow-Anordnung dem Einfallswinkel bzw. Littrow-Winkel. Mit $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$, $N = 1400 \text{ l/mm}$, $d = 17,3 \text{ cm}$ und $f = 25 \text{ cm}$ ergibt sich $\alpha = \beta_0 = 34^\circ$ und damit für den Linsenstrecker ein Wert von $D_2 = 7,96 \times 10^5 \text{ fs}^2$.

Zusätzlich zu dieser Rechnung wurde der Strahlengang in der Anordnung auch numerisch berechnet. Die Phase in Abhängigkeit von der Wellenlänge kann dabei ohne Näherungen

bestimmt werden, so dass diese Rechnung auch Abbildungsfehler berücksichtigt. Außerdem können die Auswirkungen ungenauer Justage der Anordnung vorhergesagt werden. Für die Dispersion zweiter und dritter Ordnung liefert die Rechnung kaum Unterschiede zur herkömmlichen Zwei-Gitter-Anordnung. Erst in vierter Ordnung zeigt sich ein deutlicher Unterschied.

Mit Hilfe des Terms D_2 läßt sich die Ausgangsimpulsdauer von bandbreitebegrenzten gaußförmigen Impulsen der Länge $\Delta\tau_0$ nach Durchgang durch den Linsenstrecker berechnen:

$$\Delta\tau = \Delta\tau_0 \sqrt{1 + \left(4 \ln 2 \frac{D_2}{(\Delta\tau_0)^2}\right)^2} \quad (5.2)$$

Für eine Eingangsimpulsdauer von 25 fs ergibt sich die Dauer der Ausgangsimpulse zu 88,3 ps. In Tabelle 5.3 sind nochmal alle technischen Daten des Expanders zusammengestellt.

Radius Fokussierspiegel	50 cm
Gitterstrichdichte N	1400 mm ⁻¹
Gitterabstand d	17,3 cm
Gitterwinkel	34° (Littrow)
D_2	$7,96 \times 10^5 \text{fs}^2$
D_3	$1,94 \times 10^6 \text{fs}^3$
Ausgangspulsdauer bei $\Delta\tau_0 = 25$ fs	88 ps
Transmission	≈ 72 %

Tabelle 5.3: Technische Daten des Expanders

5.4 Der nichtkollineare optisch parametrische Verstärker (NOPA)

Bei alltäglichen Lichtintensitäten kann man davon ausgehen, dass die durch Licht in transparenten Materialien induzierte Polarisation zu dem sie erzeugenden elektrischen Lichtfeld proportional ist. Als Folge gilt auch innerhalb eines Mediums das Superpositionsprinzip, woraus folgt, dass Lichtfelder verschiedener Wellenlänge nicht miteinander wechselwirken. Für die extremen Feldstärken, die in Femtosekunden-Lichtimpulsen auftreten² ist diese Näherung nicht mehr gültig. Abhängig von den genauen Materialeigenschaften folgt die Polarisation dem elektrischen Feld nicht mehr linear. Da diese nichtharmonisch schwingende Polarisation aber ebenfalls zu Lichtabstrahlung führt, können auf

²Fokussiert man einen Lichtimpuls mit Energie 1 mJ und 100 fs Dauer auf eine Fläche mit Radius 10 μm , so ergibt sich eine maximale Feldstärke von ca. 2×10^{11} V/m.

diese Weise neue Frequenzkomponenten (Oberschwingungen) entstehen bzw. Lichtfelder verschiedener Wellenlänge miteinander koppeln.

Je nachdem, welche Ordnungen der Entwicklung der nichtlinearen Polarisation berücksichtigt werden, können unterschiedliche nichtlineare Prozesse klassifiziert werden. Verwendet man nur Terme zweiter Ordnung, also die quadratische Suszeptibilität, so kann man z.B. die Frequenzverdopplung (SHG) und die parametrische Verstärkung (OPA) behandeln. Diese Prozesse kann man aus Symmetriegründen nur in Kristallen ohne Inversionszentrum beobachten. Beispiele für Effekte dritter Ordnung, die in dieser Arbeit erwähnt sind, sind die Selbstfokussierung und die Selbstphasenmodulation (siehe Abschnitt 5.2)

Da die Beschreibung der Antwort des Mediums auf das elektrische Feld mit Hilfe der nichtlinearen Polarisation mathematisch äquivalent zu dem sogenannten parametrischen Oszillator ist, bei dem die schwingende Masse (oder die Federkonstante) periodisch moduliert ist, hat sich die Bezeichnung “parametrischer Prozess” für bestimmte nichtlineare optische Prozesse eingebürgert. (Eine ausführliche Darstellung findet sich in [112].)

Im Allgemeinen werden die nichtlinearen Prozesse zweiter Ordnung durch drei Lichtfelder beschrieben, die über das Medium aneinander gekoppelt sind. In einem Teilchenbild entsprechen diese drei Felder drei wechselwirkenden Photonen. Bei dem hier betrachteten Prozess der optisch parametrischen Verstärkung wird ein sogenanntes Pumpphoton in zwei niederenergetische Photonen, die als Signal- und Idlerphoton bezeichnet werden, so aufgeteilt, dass für die Frequenzen $\omega_p = \omega_s + \omega_i$ gilt. Im Teilchenbild entspricht diese Gleichung der Energieerhaltung, wobei das Teilungsverhältnis der Energie für die zwei entstehenden Photonen durch die Wahl der experimentellen Randbedingungen einstellbar ist.

Neben der Energieerhaltung muss noch die Phasenanpassungsbedingung

$$\Delta \mathbf{k} = \mathbf{k}_p - \mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i = 0 \quad (5.3)$$

erfüllt werden, die im Photonenbild der Impulserhaltung entspricht. $\Delta \mathbf{k}$ wird auch als Phasenfehlanpassung bezeichnet. Zusammen mit der Energiebedingung kann die richtige Phasenanpassung aber nur in doppelbrechenden Medien mit geeignet polarisierten Lichtfeldern realisiert werden [112].

Bei richtiger Phasenanpassung läuft der beschriebene Prozess innerhalb des doppelbrechenden Kristalls spontan ab. Die Wahrscheinlichkeit der Energieumwandlung kann aber durch Einstrahlung von Photonen der Signalwellenlänge ω_s (Seed-Photonen) erheblich gesteigert werden. Die Intensität des Seedlichts kann dabei um viele Größenordnungen verstärkt werden.

Um extrem kurze Lichtimpulse zu erzeugen, muß die parametrische Verstärkung in einem breiten Spektralbereich erfolgen. Dies entspricht der Forderung, dass auch die erste Ableitung der Phasenfehlanpassung aus Gl. 5.3 verschwinden muss. Gleichzeitig dürfen auch die Gruppengeschwindigkeiten der Pumpimpulse und der Signalimpulse im Kristall

nicht zu stark voneinander abweichen (siehe [78]). Diese Voraussetzungen können sehr elegant in einer nichtkollinearen Geometrie erfüllt werden, bei der die Wellenvektoren \mathbf{k}_p , \mathbf{k}_s und \mathbf{k}_i zueinander nicht parallel sind [27].

Als breitbandige Quelle für die benötigten Seedphotonen wird heute in der Regel ein Weißlichtkontinuum verwendet. Durch scharfe Fokussierung von 800-nm-Pumpimpulsen mit ca. 1 μJ Energie in eine Saphirplatte wird dabei mit Hilfe der Selbstfokussierung ein dünnes Filament erzeugt, in dem vor allem durch Selbstphasenmodulation ein breites Spektrum an verschiedenen Wellenlängen entsteht [76, 11]. Die entstehenden Weißlichtpulse haben einen starken linearen Chirp in der Größenordnung von 100 fs² [12].

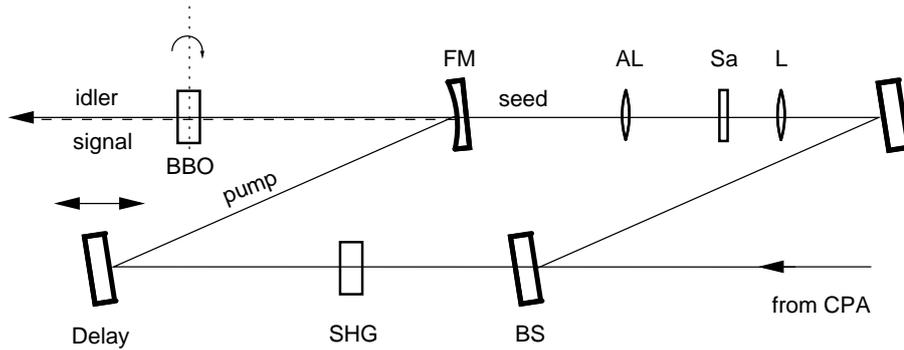


Abbildung 5.9: Schematischer Aufbau des NOPA. BS: Strahlteiler, SHG: Frequenzverdopplungskristall, L: Linse, Sa: Saphirplatte, AL: Achromatische Linse, FM: Sphärischer Spiegel (unterhalb der Zeichenebene). Der Pumpstrahl wird mit dem sphärischen Spiegel FM von unterhalb der Zeichenebene in den BBO-Kristall fokussiert (gestrichelte Linie). Während die Signalphotonen in der Zeichenebene austreten, ist die Richtung der Idlerphotonen leicht nach oben herausgekippt.

Die Wellenlängenabstimmung des nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkers erfolgt durch die Justage der Kristallgeometrie und des Nichtkollinearitätswinkels (damit werden Phasen Anpassung und Verstärkungsbandbreite beeinflusst) und durch die Einstellung des zeitlichen Überlapps von Seed- und Pumpphotonen (damit wird die Farbe der Seedphotonen eingestellt, die gleichzeitig mit den Pumpphotonen im Kristall eintreffen).

Aufgrund der großen spektralen Verstärkungsbandbreite ist eine Komprimierung der Ausgangsimpulse des NOPA auf Impulsdauern, die weit unterhalb der Dauer der Pumpimpulse liegen, möglich. Da der Chirp der Ausgangsimpulse weitgehend linear ist, reicht zur Komprimierung auf Impulsdauern von ca. 20 fs ein herkömmlicher Prismenkompressor aus.

Schon seit einigen Jahren sind nichtkollineare optisch parametrische Verstärker realisiert worden, mit denen man über den sichtbaren Spektralbereich durchstimmbare Impulse mit Impulsdauern unter 20 fs erzeugen kann [103, 12]. Die hohe Verstärkungsbandbreite ermöglicht es sogar, Impulsdauern von weniger als acht Femtosekunden zu erreichen [13].

Allerdings ist die Komprimierung dieser Impulse etwas aufwändiger.

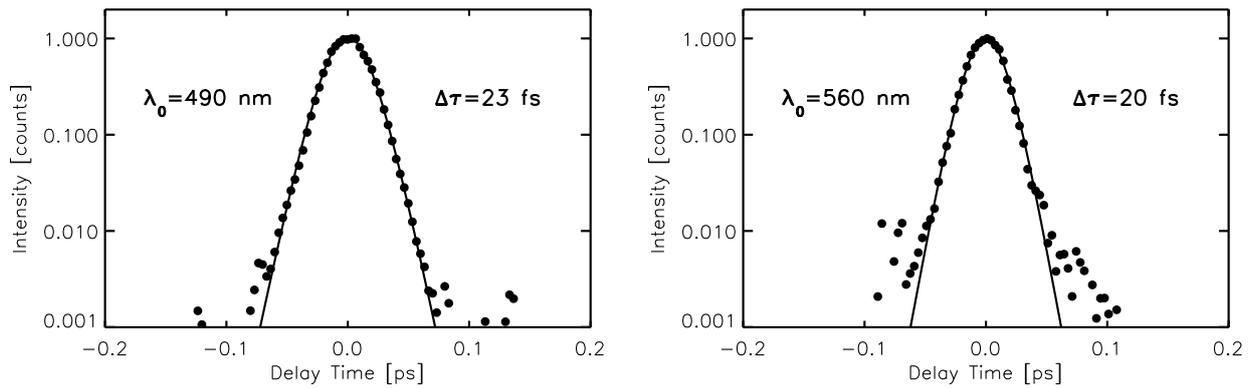


Abbildung 5.10: Intensitätsautokorrelation der Anregungsimpulse bei 490 nm und 560 nm in einfach logarithmischer Darstellung. Die durchgezogene Linie entspricht einer sech^2 -Anpassung analog zu Abb. 5.4.

Der in dieser Arbeit verwendete NOPA ist in Abb. 5.9 zu sehen. Er ist weitgehend identisch mit der Anordnung in [103]. In Abbildung 5.10 sind Autokorrelationsmessungen der Impulse gezeigt, die während der Kurzzeitmessungen an den Sensorrhodopsinproben zur Probenanregung bei 490 nm und 560 nm verwendet wurden.

6 Ultrakurzzeitspektroskopie: Aufbau, Durchführung und Auswertung der Versuche

6.1 Das Anreg-Abtast-Experiment

6.1.1 Experimenteller Aufbau

In Abb. 6.1 ist der Aufbau des Anreg-Abtast-Experimentes, mit dem die Primärreaktionen der Sensorrhodopsinproben untersucht wurden, schematisch dargestellt. Für die durchgeführten Messungen wurde nur ein Teil (50 - 100 μJ) der zur Verfügung stehenden Impulsenergie des CPA benötigt. Am Strahlteiler BS1 wird ein kleiner Teil der Energie (ca. 2 μJ) für die Erzeugung der Abtastimpulse abgezweigt. Mit der restlichen Energie wird der in Abschnitt 5.4 beschriebene nichtkollineare optisch parametrische Verstärker (NOPA) gepumpt, der im sichtbaren Spektralbereich abstimmbare Lichtimpulse liefert. Nach Komprimierung in einem Prismenkompressor aus zwei Quarz-Brewsterprismen (PC) erreicht man damit Impulse mit einer Dauer von ca. 20 fs oder kürzer. Ein sehr kleiner Teil der CPA-Energie trifft außerdem auf den Kontrolldetektor D1, mit dem die Stabilität der Impulserzeugung während der Messung überwacht wird.

Die Anregungsimpulse passieren dann den Strahlblocker Shut1, der zur Unterbrechung der Messung bei Umkehrung der Probenaustauschrichtung dient (siehe 6.1.2), bevor ein kleiner Teil auf den Detektor D2 abgezweigt wird. Diese Photodiode ermöglicht die Überwachung der Anregungsenergie. Mit der darauf folgenden Polarisationsseinheit bestehend aus einem Polarisator und einer $\lambda/2$ -Platte kann die Polarisationsrichtung des Anregungsimpulses definiert werden. Nach einem weiteren, vom Messrechner gesteuerten mechanischen Strahlblocker (Shut2, siehe unten) gelangt der Impuls dann auf die variable Verzögerungsstrecke, mit der der zeitliche Abstand zwischen Anregungs- und Abtastimpuls eingestellt wird. Anschließend werden die Impulse in die Probenküvette fokussiert und treffen nach der Transmission durch die Probe auf den Kontrolldetektor D3.

Spektral breitbandige Abtastimpulse werden durch ein Weißlichtkontinuum (siehe Ab-

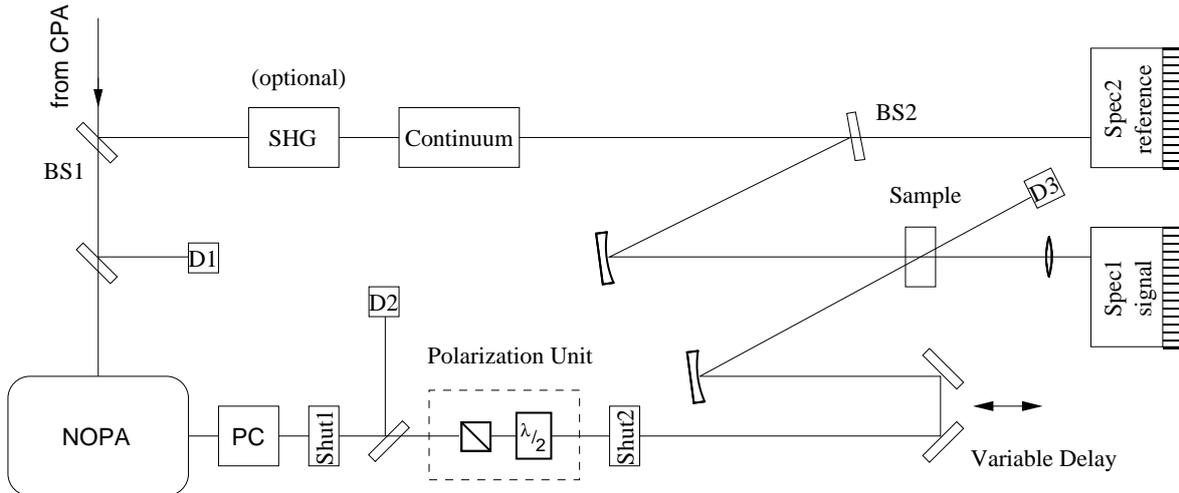


Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau des Anreg-Abtast-Experiments. BS1, BS2: Strahlteiler, SHG: optionale Frequenzverdopplungseinheit, PC: Prismenkompressor, Shut1, Shut2: mechanische Strahlblocker, D1-D3: Kontrolldetektoren, Spec1, Spec2: Spektrometer mit Photodiodenarrays.

schnitt 5.4) erzeugt. Da die Intensität des mit CPA-Impulsen bei 800 nm in Saphirkristallen erzeugten Kontinuums bei ca. 460 nm stark abnimmt, der kurzwelligere Bereich jenseits dieser Grenze aber durchaus noch von Interesse ist, werden die Messungen mit zwei verschiedenen erzeugten Kontinua durchgeführt. Dazu kann optional eine Verdopplereinheit (SHG) in den Strahlengang gebracht werden, so dass auch eine Weißlichterzeugung mit Impulsen der Zentralwellenlänge 400 nm möglich ist. Der hohe Restanteil der erzeugenden Impulse bei 400 nm bzw. 800 nm wird jeweils durch entsprechende Interferenzspiegel hinter der Kontinuumserzeugung ausgefiltert. Auf diese Weise kann bei der Messung mit dem blau-erzeugten Weißlicht ein Spektralbereich von 400-540 nm und bei Messung mit rot-erzeugtem Kontinuum von 470-700 nm aufgezeichnet werden, so dass der beobachtete Wellenlängenbereich insgesamt von 400 nm bis 700 nm reicht.

Zur exakten Bestimmung der komplexen Kinetik der untersuchten Retinalproteine sollte eine Detektion von Absorptionsänderungen in der Größenordnung von 10^{-3} realisiert werden. Bei Schuß zu Schuß-Schwankungen der Impulserzeugung von ca. 1-2% bietet hier eine Referenzdetektion große Vorteile, da dadurch die Schwankungen teilweise eliminiert werden können. Die Abtastimpulse werden dazu vor der Probenküvette an einem Strahlteiler (BS2) aufgeteilt. Der eine Teil erreicht direkt den Eingang des Referenzspektrometers (Spec2), während der andere Teil auf die Probenküvette fokussiert wird und nach Transmission der Probe in das Signalspektrometer (Spec1) gelangt. Die beiden Spektrometer sind vollkommen identisch und bilden die spektral aufgespaltenen Impulse auf 42-elementige Photodiodenarrays ab. Die Signale der einzelnen Elemente werden in speziellen Vorverstärkern [85] verstärkt, deren Ausgang mit dem Eingang eines Analog-Digitalwandlers (Fa. Lecroy, Modell 1885F) verbunden ist, der die verstärkten

elektrischen Ströme in einem kurzen Zeitfenster um den Abtastimpuls herum integrieren. Dieses Zeitfenster (Gate) wird von der elektronischen Synchronisation des CPA-Verstärkers vorgegeben und ist ca. 1 μ s lang. Das digitalisierte Integral ist proportional zum spektralen Anteil an der Gesamtenergie des Impulses, der das entsprechende Element erreicht hat. Von diesem Wert muss noch das Hinergrundsignal abgezogen werden, das durch das Pedestal¹ des A/D-Wandlers und den Dunkelstrom der Dioden verursacht wird.

Die im Rechner aus den Werten des A/D-Wandlers ermittelte Messgröße ist die relative Transmission der Probe in Abhängigkeit von der Kanalnummer i (bzw. der Wellenlänge λ_i) und der Verzögerungszeit t_D (Schrittmotorposition):

$$\frac{T(\lambda_i, t_D)}{T_0(\lambda_i)} \quad (6.1)$$

Hierbei bezeichnet T_0 die Transmission der Probe ohne Anregung. Eine ausführliche Darstellung der Berechnung dieser Größe für das verwendete Detektionsverfahren findet sich in [38]. Zu ihrer Ermittlung ist eine regelmäßige Bestimmung der Nulllinie, d.h. des Quotienten aus den Intensitäten im Signal-Zweig und Referenz-Zweig ohne Anregung der Probe notwendig, da diese Werte sich mit der Zeit aufgrund thermischer Effekte oder durch Streulichteinflüsse verändern können. Zum Abblocken des Anregungslichtes wird dazu im Versuchsaufbau ein vom Messrechner ansteuerbarer Strahlblocker (shut2) verwendet.

Insgesamt läuft bei der Aufnahme der zeitabhängigen relativen Transmission folgende automatisierte Prozedur ab:

1. Positionieren der Verzögerungsstrecke auf die Startposition
2. Wiederholte Messung der relativen Transmission. Jeder Einzelschuß wird nur akzeptiert, falls der Wert des Kontrolldetektors D1 innerhalb gewisser Grenzen liegt. Die akzeptierten Werte werden gemittelt, bis eine vorgegebene Anzahl von Einzelmessungen erreicht ist.
3. Anfahren der nächsten Position der Verzögerungsstrecke
4. Falls eine ebenfalls einstellbare Anzahl von gefahrenen Schritten erreicht ist, wird der Strahlblocker shut2 geschlossen und die Nulllinie korrigiert (Anpassung mit dynamischer Mittelung).
5. Weiter bei 2. bis die Datenaufnahme auf allen Positionen abgeschlossen ist.

¹Die Integration der eintreffenden Ladung erfolgt im A/D-Wandler in einem Kondensator. Auf diesen wird, um eine möglichst lineare und fehlerfreie Wandlung zu gewährleisten, vorher eine bestimmte Ladung, das sogenannte Pedestal, gebracht (siehe [38])

Die gemittelten Transmissionswerte einer solchen gemessenen Zeitreihe, im folgenden auch der Kürze halber “Scan” genannt, werden jeweils zusammen mit den Verzögerungszeiten in einer Datei abgespeichert. Bei den für diese Arbeit durchgeführten Messungen wurden für jeden Scan pro eingestellter Verzögerungszeit 4000-10000 Einzelereignisse gemittelt. Die Nulllinienkorrektur wurde immer nach zwei gemessenen Positionen aktualisiert. Neben der relativen Transmission der Probe werden auch die (gemittelten) Werte der Kontrolldetektoren D1, D2 und D3 in der Datei mitprotokolliert. Aufgrund dieser Daten kann auch im Nachhinein die Stabilität des Lasersystems und der Probe überprüft werden.

6.1.2 Durchführung der Messungen

Trotz der großen Fortschritte, die bei der Herstellung größerer Mengen aufgereinigter Sensorrhodopsine in den letzten Jahren gemacht wurden (siehe Abschnitt 2.6), sind die gewonnenen Mengen gemessen am Bedarf einer Ultrakurzzeitmessung immer noch äußerst gering. Die Photozyklen der gemessenen Proben (Abschnitt 2.4) dauern einige Millisekunden (BR) bis Sekunden (SRI). Daher muss ein Austausch des gesamten angeregten Probenvolumens zwischen zwei aufeinanderfolgenden Probenanregungen gewährleistet werden, damit im beobachteten Volumen nicht ein Gemisch aus verschiedenen Intermediaten der Photoreaktion der Probe entsteht.

Die Proben wurden dazu in eine Glasspritze eingefüllt, die über einen sehr dünnen Schlauch mit dem unteren Ende der Messküvette verbunden war. Das obere Ende der Küvette war wiederum mit einem Ausgleichsgefäß verbunden. Der Kolben der Glasspritze wurde von einem motorisierten Schlitten hin- und herbewegt, so dass die Probe durch die Küvette in das Ausgleichsgefäß und wieder zurück gepumpt wurde. Der senkrechte Küvettenkanal hatte eine Schichtdicke von 0,5 mm bei einer Breite von 1 mm. Will man die Flüssigkeit zwischen zwei Anregungen im Kanal um 100 μm weitertransportieren, ergibt sich eine Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min. In den Umkehrpunkten des Pumpvorganges ist der Austausch des Probenvolumens jedoch nicht gewährleistet. Die Messung musste daher stets einige Sekunden um den Umkehrzeitpunkt herum unterbrochen werden. Dazu wurde der im Anregungsweig befindliche Strahlblocker Shut1 (Abb. 6.1) automatisch von der Pumpenmechanik gesteuert. Durch die Unterbrechung des Strahlengangs an dieser Stelle wird der gesamte Messvorgang automatisch angehalten, da der Kontrolldetektor D2 unzulässige Werte für die Anregungsenergie signalisiert. Es zeigte sich, dass ca. 3 ml Probenflüssigkeit notwendig waren, um ein sinnvolles Verhältnis der Totzeiten zur nutzbaren Messzeit zu erhalten.

Allerdings stellte sich heraus, dass das schnelle Umpumpen der Probe nicht ganz ohne Einfluss auf die Messungen war. So wurde insbesondere bei streuenden Proben ein Beitrag zum registrierten Transmissionssignal beobachtet, der von der Pumprichtung abhing. Die Ursache für diesen Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. In einigen Messungen konnte dieses Artefakt durch die erwähnten Korrekturme-

chanismen und die Mittelung nicht vollständig unterdrückt werden (siehe Auswertung).

Um die Proben möglichst wenig belichten zu müssen, wurde die Größe des Anregfokus mit $85\ \mu\text{m}$ nur minimal über der des Abtastfokus ($80\ \mu\text{m}$) gewählt. Da die Fokusgröße des Weißlichtes jedoch bei kurzen Wellenlängen geringfügig zunimmt und die Bestimmung der Bündeldurchmesser nicht sehr genau ist, muss bei der Auswertung der Daten auf der kurzwelligen Seite der mit $800\ \text{nm}$ -Weißlicht gemessenen Spektren darauf geachtet werden, dass u.U. Artefakte auftreten können. Durch den großen Überlapp der in den beiden unterschiedlichen Spektralbereichen aufgenommenen Daten, können aber eventuelle Verfälschungen der Signalamplituden erkannt werden.

Die von sSRII, pSRII und sSRI zur Verfügung stehenden Probenmengen reichten jeweils nur für eine Füllung der Pumpapparatur. Damit wurde jeweils eine Messserie pro Spektralbereich und Probe durchgeführt. Nach jeder Messserie (ca. 10-30 Scans in einem Spektralbereich) wurden Dauerstrichspektren aufgenommen und mit den vor der Messung aufgenommenen Spektren (siehe Abb. 6.2) verglichen. Zum einen wurde die Zahl der verwertbaren Scans durch die zunehmende Streuung der Proben in Verbindung mit den oben erwähnten Artefakten aufgrund des Probenaustausches limitiert. Zum anderen zeigten sich aber nach einigen Scans auch eine je nach Probe unterschiedliche, geringfügige Abnahme der Chromophorabsorption.

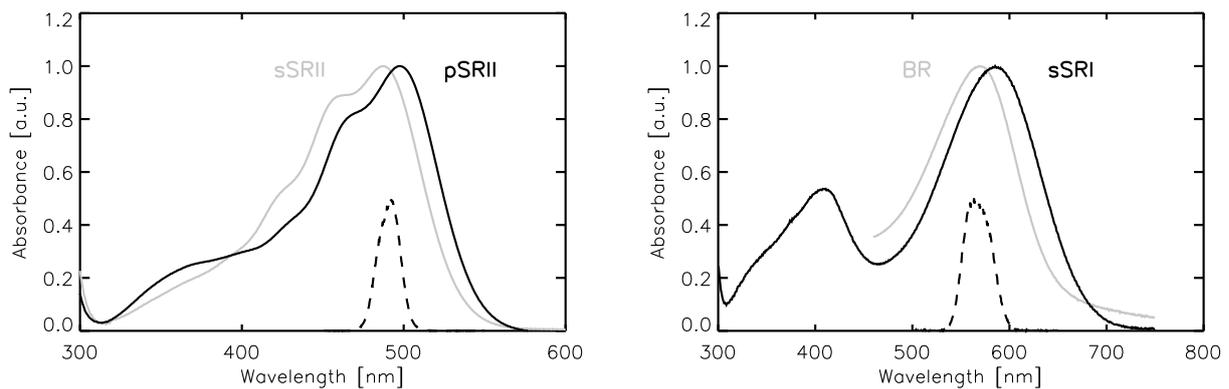


Abbildung 6.2: Absorptionsspektren der gemessenen Proben (durchgezogene Linien) und Spektren der Anregungsimpulse (gestrichelte Linien).

Die Konzentration aller Proben wurde so eingestellt, dass die Absorption in der Messküvette ($d=0,5\ \text{mm}$) etwa $0,3$ betrug, was einer Transmission von 50% entspricht. Die Konzentration der Proben lag damit bei ca. $0,1\ \text{mM}$ und im Anregungsvolumen ($3\ \text{nl}$) befanden sich daher 2×10^{11} Proteinmoleküle. Die Energie der Anregungsimpulse lag bei allen Messungen bei ca. $50\ \text{nJ}$. Weniger als zwei Drittel dieser Energie entfallen auf das hier betrachtete Volumen² mit Durchmesser $D=85\ \mu\text{m}$. Berücksichtigt man noch die Transmission der Probe und die Reflexion am Küvettenglas, so ergibt sich insgesamt, dass

²Dies hängt mit der Definition des Bündeldurchmessers zusammen. Nimmt man ein gaußförmiges Strahlprofil an, entfallen 56% der Energie auf die Fläche innerhalb des hier bestimmten Radius.

weniger als 20% der Probenmoleküle angeregt werden.

Durch nichtlineare optische Effekte kommt es bei sehr kurzen Verzögerungszeiten, bei denen Anreg- und Abtastimpulse miteinander wechselwirken zu nichtresonanten Messartefakten [52]. Diese können bei einer Messung im reinen Lösungsmittel der Probe gut beobachtet werden. Durch Subtraktion von Messungen des jeweiligen Lösungsmittels von den eigentlichen Messkurven können diese Artefakte weitgehend eliminiert werden.

Insgesamt liefen die Messungen in der folgenden Reihenfolge ab:

1. Einstellung der Anregungswellenlänge auf 490 nm, Charakterisierung der Anregungsimpulse (siehe Abbildungen 6.2 und 5.10).
2. Einbau der optionalen SHG-Einheit zur Erzeugung des Abtastweißlichts bei 400 nm, Eichung der Spektrometer und Justage des Experiments.
3. Messung eines Kontrollfarbstoffs (DCM) und der Proben pSRII und sSRII und der zugehörigen Pufferlösungen bei paralleler Polarisationsgeometrie im Spektralbereich von 400-540 nm. Die Probe pSRII wurde nach der Messung eingefroren.
4. Entfernen der SHG-Einheit, Eichung und Justage des Experiments
5. Messung von DCM und der Proben pSRII und sSRII und ihrer Lösungsmittel bei paralleler und bei senkrechter Polarisationsgeometrie im Spektralbereich von 470 nm bis 700 nm. Abschließend Messung einer BR-Probe als Referenz.
6. Einstellung der Anregungswellenlänge auf 560 nm, Charakterisierung der Anregungsimpulse (siehe Abbildungen 6.2 und 5.10) und Justage des Experiments.
7. Messung eines Kontrollfarbstoffs (Kristallviolett) und der Probe sSRI bei paralleler Polarisationsgeometrie im Spektralbereich von 470-700 nm. Abschließend Messung von BR.

6.2 Datenauswertung

Folgende Korrekturen müssen an den aufgenommenen Daten durchgeführt werden, bevor eine sinnvolle Interpretation möglich ist:

- **Mittelung:** Die einzelnen nacheinander an einer Probe aufgenommenen Scans müssen gemittelt werden.
- **Nullpunktskorrektur:** Die durch den Chirp des Abtastlichtes verursachte Verschiebung der Zeitnullpunkte der einzelnen Kanäle muss rückgängig gemacht werden.

- **Lösungsmittelkorrektur:** Artefakte, die durch nichtlineare Wechselwirkung von Anregungs- und Abtastimpuls im Lösungsmittel entstehen, müssen abgezogen werden.
- **Verbindung verschiedener Meßbereiche:** Messungen aus den zwei unterschiedlichen Spektralbereichen müssen auf gleiche Signalhöhen skaliert und aneinandergesetzt werden.

Als Ergebnis erhält man einen Datensatz, der die zeitliche Änderung der Probenabsorption³ im gesamten gemessenen Spektralbereich möglichst korrekt wiedergibt. Für eine verlässliche Korrektur des umfangreichen Datenmaterials ist insbesondere entscheidend, dass die Ergebnisse zu jedem Zeitpunkt der Korrektur schnell graphisch aufbereitet werden können. Außerdem muss die Plausibilität der Korrekturen überprüft werden und Zwischenergebnisse leicht gespeichert werden können, damit die Prozedur nachvollziehbar bleibt.

Da zu Beginn dieser Arbeit keine wirklich geeignete Software für die Verarbeitung der Daten zur Verfügung stand wurde in Zusammenarbeit mit Sebastian Spörlein ein Programmpaket in der Programmiersprache IDL entwickelt, das umfangreiche Möglichkeiten der Verarbeitung und Visualisierung von zeitaufgelösten und stationären spektroskopischen Daten bietet. Neben der interaktiven Durchführung der oben erwähnten Korrekturen können außerdem mit diesem Paket folgende Aufgaben innerhalb einer einfach bedienbaren graphischen Oberfläche bewältigt werden:

- **Visualisierung:** korrigierte Messdaten können auf verschiedene Weise 2- oder 3-dimensional dargestellt werden. Alle Abbildungen in dieser Arbeit, in denen Messdaten zu sehen sind, wurden ausschließlich mit der beschriebenen Software erstellt.
- **Datenanpassung:** Eine Anpassung von Messdaten mit verschiedensten Modellen für einzelne Kanäle sowie eine globale Anpassung ganzer Datensätze mit Ratenmodellen ist möglich. Für die globale Anpassung wurde hierzu der URMEL-Algorithmus [33] in das Programm eingebunden (siehe auch Abschnitt 6.2.2).
- **Dauerstrichspektren:** Stationäre spektroskopische Daten können von verschiedenen Spektrometern importiert, archiviert, verarbeitet und dargestellt werden. Dies gilt ebenso für Autokorrelationsmessungen, etc.

6.2.1 Durchführung der Korrekturen

Wie bereits erwähnt, besitzen die zum Abtasten verwendeten Weißlichtimpulse nach ihrer Erzeugung einen großen linearen Chirp (siehe Abschnitt 5.4). Dieser wird im ver-

³Nach der Mittelung der Einzelscans erfolgt eine Umrechnung der ursprünglichen Messgröße (rel. Transmission) in eine Absorptionsänderung gemäß der Definition der Absorption ($T = 10^{-A}$, T: Transmission, A: Absorption)

wendeten Messaufbau durch weitere Materialien im Strahlengang (Filter, Küvettenglas) noch vergrößert, bevor die Abtastimpulse in die Probe gelangen. In den Messdaten äußert sich diese zeitliche Verzögerung der verschiedenen Abtastwellenlängen in einer Verschiebung der Nullpunkte der Signale in den einzelnen Kanälen. Diese Verschiebung betrug zwischen zwei benachbarten Detektorelementen etwa 20 fs bei 700 nm und stieg bis zu etwa 120 fs bei 400 nm an.

Die Nullpunktverschiebungen der einzelnen Kanäle wurden innerhalb der graphischen Darstellung des Auswertprogramms zunächst per "Augenmaß" korrigiert. Da bei den meisten Abtastwellenlängen am Zeitnullpunkt ein im Verhältnis zur Zeitauflösung der Messung praktisch instantaner Anstieg bzw. Abfall der Absorption aufgrund der elektronischen Anregung der Moleküle stattfindet, können die Nullpunkte für einen Großteil der Kanäle relativ genau geschätzt werden. Die geschätzten Nullpunktverschiebungen wurden dann gegen die Wellenlänge aufgetragen und mit einem theoretischen Modell verglichen, in dem die Verschiebung aus der Gruppengeschwindigkeitsdispersion beim Durchgang durch verschiedene optische Materialien berechnet wurde. Eine exakte Vorhersage der Nullpunktverschiebung aus den Schichtdicken der im Strahlengang des Experiments vorhandenen Materialien war allerdings nicht möglich, da diese von der genauen Justage des Weißlichts abhängig ist. Umgekehrt war es jedoch in allen Fällen möglich, das Modell so an die geschätzten Werte anzupassen, dass sich für die Parameter (Schichtdicken von Quarzglas, BK7, Wasser und Saphir im Strahlengang) annähernd die tatsächlichen Werte ergaben. Um Fehler der ursprünglichen Abschätzung bei Abtastwellenlängen, an denen der Nullpunkt mit dem Auge nicht eindeutig erkannt werden kann, zu beheben, wurden anschließend die Ergebnisse der ersten Schätzung durch die optimal angepassten Werte des Modells ersetzt. Bei der Auswertung aufeinanderfolgender Messungen, die ohne Änderung der Justage durchgeführt wurden, konnten die Nullpunkte der einzelnen Kanäle auf diese Weise auf ca. 10 fs genau reproduziert werden.

Die beobachteten Signalhöhen um den Zeitnullpunkt bei den Messungen an den Proteinlösungen lagen bei der verwendeten Anregungsenergie von ca. 50 nJ etwa eine Größenordnung über den in den reinen Lösungsmitteln gemessenen Artefakten. Zudem treten die kohärenten Artefakte in den Probenlösungen nur in geringerem Maße als in den reinen Lösungsmitteln auf, da die Intensität der Impulse aufgrund der Probenabsorption mit der Eindringtiefe stetig abnimmt. Das Abziehen der Lösungsmittelleffekte hatte daher nur geringen Einfluß auf die gemessenen Absorptionsänderungen. Auf eine akribische Anpassung kleiner zeitlicher Verschiebungen zwischen Proben- und Lösungsmittelmessungen wurde daher verzichtet.

Die Messungen an den SRII-Proben in verschiedenen Spektralbereichen konnten anhand des vorhandenen Überlapps der Messbereiche gut zusammengesetzt werden. Da die Signalhöhen einer einzelnen Messserie von mehreren, schlecht kontrollierbaren Faktoren wie den genauen Bündelquerschnitten, oder der Probenstreuung abhängen, kann dabei eine Skalierung notwendig sein. Während sich die Messungen an sSRII praktisch ohne Skalierung zusammenfügen ließen, mußten die Messungen im blauen Spektralbereich an pSRII um den Faktor 2,4 skaliert werden, um eine Übereinstimmung mit dem roten

Spektralbereich zu erzielen.

6.2.2 Datenanpassung und Berechnung von Absorptionsquerschnitten

Im folgenden soll in knapper Form ein Modell hergeleitet werden, mit dem die in den Femtosekundenmessungen gewonnenen Daten angepasst werden können und dessen Gültigkeit und Grenzen aufgezeigt werden. Die Beschreibung der transienten Absorptionsänderung für Verzögerungszeiten $t_D > 200$ fs geschieht durch ein Ratenmodell und folgt im wesentlichen den Ausführungen in Holzapfel 1989 [40] und Finkele et al. 1990 [24]. Allerdings müssen bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen an Retinalproteinen gegenüber den dort diskutierten Modellen einige Besonderheiten berücksichtigt werden.

Die transiente Absorptionsänderung

Das im Folgenden beschriebene Ratenmodell geht davon aus, dass die Probe bei der beobachteten Reaktion eine bestimmte Anzahl n verschiedener Zustände annehmen kann, die durch ihre Absorptionsquerschnitte $\sigma_i(\lambda)$, $i = 0, 1, \dots, n$ spektroskopisch charakterisiert sind. Mit Hilfe der von der Verzögerungszeit t_D abhängigen Besetzungsdichten $N_i(t_D)$ kann dann die Absorptionsänderung der Probe beschrieben werden [40]:

$$\Delta A(\lambda_{pr}, t_D) = \frac{d}{\ln 10} \cdot \sum_{i=1}^n (\sigma_i(\lambda_{pr}) - \sigma_0(\lambda_{pr})) \cdot N_i(t_D) \quad (6.2)$$

Hierbei sind d die Schichtdicke der Probe und λ_{pr} die Abtastwellenlänge.

Ratenmodell und Messdatenanpassung

Von gut definierten Zuständen kann man nur ausgehen, wenn die Relaxationszeiten innerhalb der einzelnen Zustände klein gegenüber deren Lebensdauern sind. In diesem Fall erfolgt die Reaktion zwischen zwei Zuständen stets von einem relaxierten Zustand aus (nichtadiabatischer Fall) und kann durch eine zeitlich konstante Rate beschrieben werden. Für den elektronisch angeregten Zustand von BR kann diese Relaxationszeit aus den Lochbrennexperimenten mit höchster Zeitaufösung von Mathies et al. [63] mit etwa 100 bis 150 fs angegeben werden. Will man Absorptionsänderungen in diesem Zeitbereich theoretisch beschreiben, muss eine detaillierte quantenmechanische Beschreibung verwendet werden (siehe dazu [74]). In dieser Arbeit wurden alle Daten für Verzögerungszeiten $t_D > 200$ fs mit Ratenmodellen angepasst.

Das Gleichungssystem für die Berechnung der Besetzungsdichten $N_i(t_D)$ der n Zustände lautet dann:

$$\frac{\partial N_i}{\partial t} = - \sum_{j=0}^n k_{ij} \cdot N_j \quad (6.3)$$

Dabei sind die k_{ij} die Ratenkonstanten beim Übergang vom Zustand j in den Zustand i . Die allgemeine Lösung hat die Form

$$N_i(t) = \sum_{j=0}^n M_{ij} \exp(-t/\tau_j) \quad (6.4)$$

mit den Zeitkonstanten τ_j . Die Kehrwerte dieser Zeitkonstanten $1/\tau_j$ entsprechen dabei den Eigenwerten der Ratenmatrix k_{ij} und die Matrix M_{ij} setzt sich spaltenweise aus den Eigenvektoren der Ratenmatrix zusammen. Die Länge der Eigenvektoren ist dabei zunächst beliebig, d.h. es bleiben noch n freie Parameter. Diese können über die Anfangsbedingungen der Differentialgleichung 6.3, d.h. die Besetzungsdichten am Zeitnullpunkt $N_i(t=0)$ bestimmt werden. Einsetzen von Gl. 6.4 in Gl. 6.2 liefert:

$$\begin{aligned} \Delta A(\lambda_{pr}, t_D) &= \sum_{j=0}^n \left[\frac{d}{\ln 10} \cdot \sum_{i=1}^n (\sigma_i(\lambda_{pr}) - \sigma_0(\lambda_{pr})) \cdot M_{ij} \right] \cdot \exp(-t_D/\tau_j) \\ &= \sum_{j=0}^n a_j(\lambda_{pr}) \cdot \exp(-t_D/\tau_j) \end{aligned} \quad (6.5)$$

Die transiente Absorption hat also die Form einer Überlagerung von bis zu n Exponentialfunktionen, wobei n der Anzahl der möglichen Zustände entspricht. Tritt eine Entartung von zwei oder mehreren Eigenwerten von k_{ij} auf so verringert sich die Zahl der beobachtbaren exponentiellen Zerfälle. Für den Fall, dass bei der betrachteten Reaktion ein bestimmter Zustand zwar mit der Zeit besetzt, aber nicht mehr entvölkert wird, wird ein Eigenwert der Matrix k_{ij} gleich Null. In den Messkurven entspricht dies einer unendlich langen Zeitkonstante τ . Beispiel dafür ist die Bildung eines langlebigen (d.h. gegenüber dem betrachteten Zeitbereich unendlich lange lebenden) Photoprodukts.

Zur Anpassung der Messkurven muss schließlich noch berücksichtigt werden, dass die Anregung und das Abtasten mit Lichtimpulsen einer gewissen Breite erfolgt. Mathematisch kann dies durch eine Faltung einer Instrumentenfunktion, in diesem Fall der Kreuzkorrelationsfunktion $K(t)$ der Impulse mit der idealen Absorptionsänderung ausgedrückt werden, die sich bei einer Messung mit δ -förmigen Impulsen ergäbe:

$$\Delta\tilde{A}(\lambda_{pr}, t_D) = \int_0^\infty \left[\sum_{j=0}^n a_j(\lambda_{pr}) \cdot \exp(-t_D/\tau_j) \right] \cdot K(t_D - t) dt \quad (6.6)$$

Die erreichbare Zeitauflösung der Messung ist damit mit der Breite der Kreuzkorrelationsfunktion $K(t)$ verknüpft. Allein aufgrund der Ausdehnung der einzelnen Detektorelemente (90% ihres Abstandes) erwartet man als Folge des Weißlichtchirps (siehe 6.2.1) eine bestmögliche Zeitauflösung der Messung von ca. 20 - 110 fs je nach Wellenlänge. Weiterhin wird die erreichbare Zeitauflösung auch von der Länge der Anregimpulse, der Strahlgeometrie am Probenort und durch die Gruppengeschwindigkeitsunterschiede (GVM) zwischen Anregungs- und Abtastwellenlänge limitiert⁴, so dass sie auch bei Wellenlängen mit geringem Chirp nicht erheblich unter 80 fs liegen sollte. Da die Messdaten aber erst im Bereich $t_D > 200$ fs angepasst wurden, spielt der exakte Wert keine Rolle. Alle Anpassungsrechnungen wurden daher mit einer gaußförmigen Kreuzkorrelationsfunktion der Breite 80 fs durchgeführt.

Zur Realisierung der Anpassung wurde der am Lehrstuhl entwickelte URMEL-Algorithmus [33] in die Datenauswertungssoftware integriert. Dieses Programm passt die Zeitkonstanten τ_j nach der Methode der kleinsten Quadrate mit einem Marquartalgorithmus an und berechnet die Amplituden $a_j(\lambda_{pr})$. Die Zahl der Zeitkonstanten muss dabei vorgegeben werden.

Ein Ratenmodell für Bakteriorhodopsin

In Abb. 6.3 ist das in dieser Arbeit zugrundegelegte Ratenmodell für die Primärreaktion von BR gezeigt. Dieses Modell dient dabei auch als Grundlage für eine Interpretation der Ergebnisse der Messungen an den Sensorrhodopsinproben.

In den in Kapitel 3 erwähnten bisherigen Untersuchungen der Primärreaktion hat sich gezeigt, dass der Übergang vom elektronisch angeregten Zustand (hier mit S_1 bezeichnet) in das erste Grundzustandsintermediat J gut durch eine konstante Übergangsrate beschrieben werden kann. Außerdem wird auf der Pikosekundenzeitskala noch der Übergang $J \rightarrow K$ beobachtet. Aufgrund der Quantenausbeute von 64% [97] muss weiterhin die Rückreaktion in den Grundzustand berücksichtigt werden. Da jedoch sowohl der Grundzustand als auch das Intermediat K auf der betrachteten Zeitskala unendlich lange leben, erwartet man für die vier Zustände drei beobachtbare Zeitkonstanten, von denen eine unendlich groß ist. Insgesamt lautet das Ratengleichungssystem:

⁴Während die geometrische Verlängerung von der Wellenlänge unabhängig ist, führt die GVM zu einer Verschlechterung der Zeitauflösung bei Abfragewellenlängen die weit von der jeweiligen Anregungswellenlänge entfernt sind.

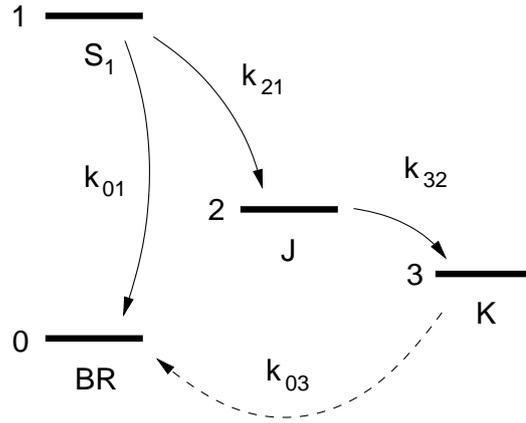


Abbildung 6.3: Ratenmodell der Primärreaktion von BR

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} N_1 \\ N_2 \\ N_3 \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} k_{21} + k_{01} & 0 & 0 \\ -k_{21} & k_{32} & 0 \\ 0 & -k_{32} & k_{03} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_1 \\ N_2 \\ N_3 \end{pmatrix} \quad (6.7)$$

Dabei wird k_{03} als sehr klein angenommen⁵. Die Eigenwerte der Ratenmatrix aus Gl. 6.7 entsprechen den Diagonalelementen. D.h. die in den Transienten beobachteten Zeitkonstanten (Gl. 6.4) lauten $\tau_1 = 1/(k_{21} + k_{01})$, $\tau_2 = 1/k_{32}$, $\tau_3 = 1/k_{03} = \infty$. Zur Bestimmung der Raten k_{21} und k_{01} benötigt man dann nur noch die Quantenausbeute für den Übergang nach J, die ja dem Verhältnis k_{21}/k_{01} entsprechen muss.

Hat man nun die Ratenmatrix mit Hilfe der Quantenausbeute und der ermittelten Zeitkonstanten bestimmt, so kann also die Matrix M_{ij} aus den Anfangsbedingungen berechnet werden. Damit lassen sich schließlich nach Gl. 6.5 die Absorptionsquerschnitte der Zustände angeben:

$$\sigma_i(\lambda_{pr}) - \sigma_0(\lambda_{pr}) = \frac{\ln 10}{d} \cdot \sum_{j=0}^n a_j(\lambda_{pr}) \cdot (M^{-1})_{ji} \quad (6.8)$$

Anisotropie

Bei einem Vergleich der berechneten Absorptionsquerschnitte mit Daten aus Dauerstrichexperimenten (wie z.B. Tieftemperaturspektren) muss allerdings im Allgemeinen zwischen Messungen mit und ohne definierte Polarisationsgeometrie unterschieden werden. Bei einer Anregung der Probe mit Impulsen einer bestimmten Polarisationsrichtung werden bevorzugt solche Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Polarisierung der Impulse liegt. Eine Drehung der Übergangsmomente im Laufe des beob-

⁵bei $k_{03} = 0$ ergeben sich Probleme bei der numerischen Berechnung der Eigenwerte

achteten Prozesses kann daher die ebenfalls mit einem polarisierten Abtastimpuls beobachtete transiente Absorption verändern. Ein Maß für die Orientierung der Übergangsmomente ist die Anisotropie, die sich aus den Messungen der transienten Absorption bei paralleler und senkrechter Polarisationsgeometrie folgendermaßen berechnet [25, 105]:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (6.9)$$

Hierbei sind I_{\parallel} und I_{\perp} die Anreg-Abtast-Signale bei paralleler bzw. senkrechter Polarisationsgeometrie. Im Falle kleinerer bis mittlerer organischer Moleküle (z. B. Farbstoffmoleküle wie Kristallviolett, Oxazin oder Rhodamin 6G) beobachtet man auf der Pikosekundenzeitskala einen Zerfall des Anisotropiesignals aufgrund der Rotationsdiffusion [25]. Bei großen Biomolekülen wie BR oder bakteriellen Reaktionszentren [105] finden solche Rotationen jedoch auf einer viel langsameren Zeitskala statt und spielen für Ultrakurzzeitmessungen keine Rolle mehr. Änderungen im Anisotropiesignal ergeben sich in diesem Fall nur durch die Übergänge zwischen den Zuständen der Moleküle, die verschieden orientierte Übergangsmomente besitzen können. Die Anisotropie lässt sich schreiben als

$$r(t) = \frac{2}{5} \langle P_2(\cos(\theta)) \rangle, \quad (6.10)$$

wobei P_2 das Legendrepolynom 2. Grades und θ den Winkel zwischen dem angeregten und abgetasteten Übergangsdipolmoment bezeichnen. Findet keine Umorientierung des Übergangsmoments statt ($\theta = 0$), so sollte daher die Anisotropie zeitlich konstant sein und den Wert 0,4 haben.

7 Ultrakurzzeitspektroskopie: Ergebnisse

7.1 Bakteriorhodopsin

In Abb. 7.1 sind die Ergebnisse der Messungen an BR für sehr kleine Verzögerungszeiten ($t_D \leq 200$ fs) gezeigt. Im Bereich von 530 nm bis 640 nm beobachtet man innerhalb der ersten 80 fs eine Abnahme der Absorption. Dieser Spektralbereich ist dominiert durch das nach Lichtanregung im Rahmen der Zeitauflösung des Experiments instantane Ausbleichen der BR-Grundzustandsbande mit Maximum bei ca. 570 nm (siehe Abb. 6.2). Gleichzeitig sieht man eine starke, ebenfalls instantan einsetzende und sehr breitbandige Absorption des angeregten Zustands mit einem Maximum bei ca. 470 nm. Da sowohl die Grundzustandsabsorption als auch die Absorption des elektronisch angeregten Zustands spektral sehr breit sind, kompensieren sich beide Effekte – vor allem in der blauen Flanke der Grundzustandsbande (um 530 nm) – teilweise. Außerhalb der Grundzustandsabsorption zwischen 650 nm und 720 nm kann eine schnelle Abnahme der Absorption beobachtet werden, bei der es sich um stimulierte Emission handeln könnte (siehe dazu Fluoreszenzspektrum in Abb. 4.2). Eine genaue Interpretation wird zunächst dadurch erschwert, dass der spektrale Verlauf der S_1 -Absorption nicht genau bekannt ist und die Absorptionsänderungen in diesem Bereich schon relativ gering sind.

Geht man davon aus, dass das Ausbleichen des Grundzustands und das Einsetzen der Excited-State-Absorption innerhalb der Zeitauflösung der Messung von ca. 100 fs instantan erfolgen und dann die Rückreaktion in den Grundzustand ohne spektrale Verschiebung des S_1 -Zustands abläuft, so müsste ein isosbestischer Punkt (bei ca. 520 nm) zu erkennen sein, bei dem sich beide Effekte zu allen Verzögerungszeiten genau kompensieren. Dies ist eindeutig nicht der Fall. Aus den transienten Spektren bei 0, 40 und 80 fs lässt sich eindeutig eine Blauverschiebung des Spektrums des angeregten Zustands innerhalb der ersten 100 fs ablesen.

In der zeitlichen Änderung der transienten Absorption (Abb. 7.1 rechter Teil) kann diese schnelle spektrale Verschiebung ebenfalls gut beobachtet werden. Bei einer Abfragemwellenlänge von 464 nm sieht man ein Ansteigen der Absorption auf den maximalen Wert in ca. 150 fs. Da die Anstiegszeit aber in etwa der Zeitauflösung des Experiments entspricht, ist eine zusätzliche Kinetik innerhalb dieses Anstiegs hier nur schwer zu

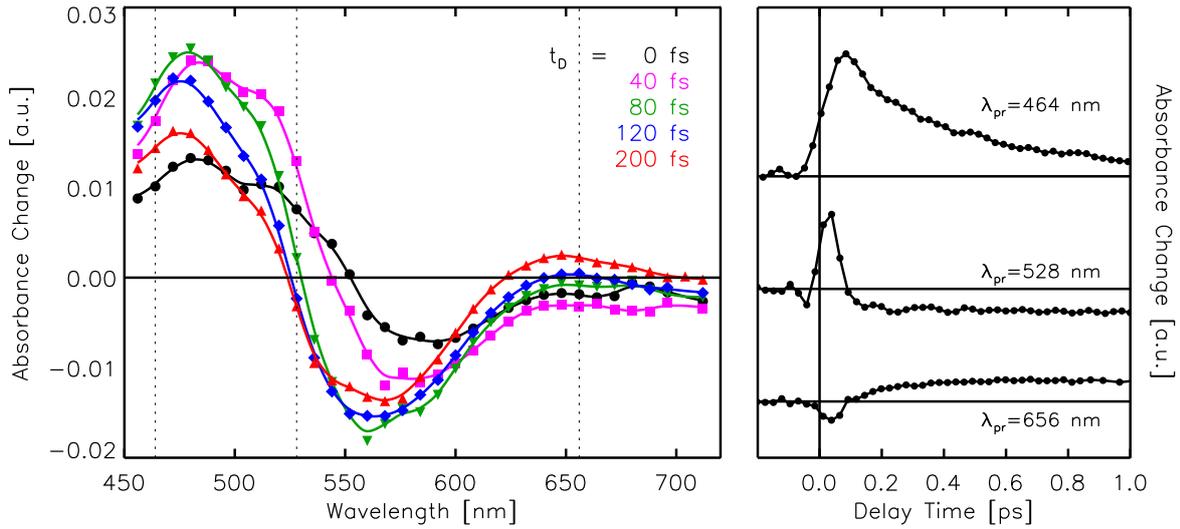


Abbildung 7.1: Schnellste Änderungen der transienten Absorption von BR nach der Anregung ($\lambda_{pu}=560$ nm). Links: Transiente Spektren bei verschiedenen Verzögerungszeiten t_D . Rechts: Transienten im Zeitbereich bis 1 ps bei den Abtastwellenlängen 464 nm, 528 nm und 656 nm. Diese Wellenlängen sind im linken Teil durch gestrichelte Linien markiert.

bestimmen. Klarer dagegen liegen die Verhältnisse bei 528 nm. Bei dieser Wellenlänge kompensieren sich die Absorption des angeregten Zustands und das Ausbleichen des Grundzustands soweit, dass nach ca. 200 fs nur noch eine kleine Absorptionsabnahme übrigbleibt, die noch dazu durch die weitere Reaktion (Bildung von J) kaum verändert wird. Innerhalb der ersten 200 fs zeigt sich dagegen eine sehr schnelle Zunahme und anschließende Abnahme der Absorption. Die Ergebnisse der Messungen am Lösungsmittel zeigen deutlich, dass es sich dabei nicht um ein Nullpunktsartefakt (siehe 6.2.1) handeln kann. Diese Artefakte sind bei der im Experiment verwendeten, relativ kleinen Anregungsenergie (50 nJ) deutlich kleiner als die bei 528 nm in der Probe beobachteten schnellen Absorptionsänderungen.

Eine sehr schnelle Änderung der transienten Absorption im gleichen Zeitbereich kann auch z.B. bei 656 nm beobachtet werden. Bei dieser Wellenlänge außerhalb der Grundzustandsbande sollte das Signal zu kurzen Zeiten lediglich aus stimulierter Emission und Absorption des angeregten Zustands bestehen, die sich mehr oder weniger gegenseitig kompensieren. Unmittelbar nach dem Nullpunkt beobachtet man ein negatives Signal, das innerhalb der ersten 100 fs verschwindet, und danach eine Zunahme der Absorption. Dieses Verhalten wurde auch in den Messungen von Dobler et. al [18] beobachtet, die mit einer Zeitauflösung von ca. 120 fs durchgeführt wurden. Es könnte als eine sehr schnelle Rotverschiebung der stimulierten Emission in den ersten 100 fs interpretiert werden, da das Maximum der Fluoreszenz bei ca. 700 nm liegt (siehe Abb. 4.2).

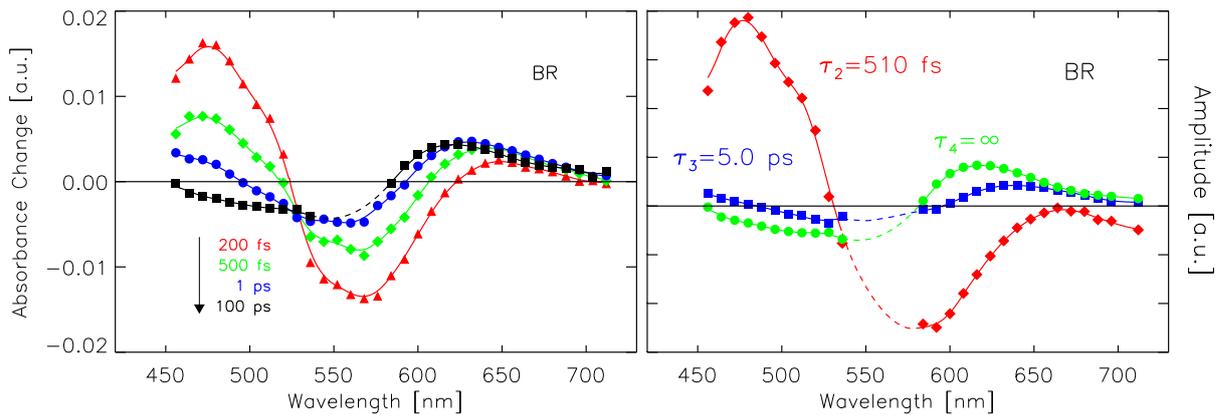


Abbildung 7.2: Links: Transiente Spektren von BR bei Verzögerungszeiten von 200 fs, 500 fs, 1 ps und 100 ps. Rechts: Amplitudenspektren einer globalen Datenanpassung mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 100$ fs (nicht gezeigt), $\tau_2 = 510$ fs, $\tau_3 = 5.0$ ps, $\tau_4 = \infty$. Die Daten im Bereich der gestrichelten Linien konnten nicht verwendet werden (siehe Text).

Die spektralen Änderungen der transienten Absorption im weiteren Verlauf der Primärreaktion sind im linken Teil von Abb. 7.2 dargestellt. Da bei dieser Messserie alle Datenpunkte im Bereich der Anregungswellenlänge (540 - 590 nm) im Zeitbereich $\tau_D > 1$ ps stark durch Streulicht verfälscht wurden, sind sie in der Darstellung in Abb. 7.2 und bei der Datenanpassung nicht berücksichtigt (gestrichelte Linien in Abb. 7.2). Innerhalb der ersten Pikosekunde verschwindet die Absorption um 460 nm fast vollständig und auch der ausgebleichte Grundzustand wird teilweise wieder populiert. Die Form des Differenzspektrums nach 1 ps (blaue Kurve) entspricht einer Rotverschiebung des Absolutspektrums gegenüber dem Ausgangszustand (Absorptionzunahme für $\lambda > 580$ nm und -abnahme für $\lambda < 580$ nm). Dies wird im allgemeinen als Bildung des Intermediats J_{600} interpretiert (siehe Abb. 2.4). Im Folgenden beobachtet man nur noch sehr geringe Änderungen der Absorption, die insgesamt einer geringen Blauverschiebung des Absolutspektrums entsprechen und damit dem Übergang von J_{600} nach K_{590} entsprechen.

Die beobachteten Absorptionsänderungen wurden mit Hilfe des in Abschnitt 6.2.2 beschriebenen Fitalgorithmus angepasst. Die Daten innerhalb der ersten 200 fs nach dem Zeitnullpunkt wurden in dieser Anpassung nicht berücksichtigt, da die in diesem Zeitbereich beobachteten schnellsten Phänomene durch ein Ratenmodell auf keinen Fall befriedigend beschrieben werden können. Da aber diese ersten Prozesse den Verlauf der Absorption nach 200 fs noch beeinflussen können, wurde bei der Datenanpassung eine schnelle Komponente mit einer festen Zeitkonstante von $\tau_1 = 100$ fs hinzugefügt. Weiterhin wurden drei Zerfallszeiten τ_2 , τ_3 und τ_4 angenommen, wobei τ_4 zur Beschreibung der Produktabsorption als unendlich festgelegt wurde. Schließlich wurde der Algorithmus gestartet, wobei für die Zeiten τ_2 und τ_3 verschiedene Startwerte in der Nähe der

Literaturwerte für den S_1 -Zerfall (500 fs) und den Übergang $J \rightarrow K$ (3-5 ps) getestet wurden.

Für die beiden Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 lieferte die Anpassung für verschiedene Startwerte gut reproduzierbar die Werte 510 fs und 5.0 ps. Die zu diesen Zeitkonstanten und zu $\tau_4 = \infty$ gehörigen Amplitudenspektren sind im rechten Teil von Abb. 7.2 zu sehen¹. Zum Test dieser Ergebnisse wurden auch Anpassungen durchgeführt, bei denen τ_1 von 100 fs auf 200 fs vergrößert wurde. Dies führte erwartungsgemäß zu einer leichten Verlängerung der folgenden Zeitkonstanten auf $\tau_2 = 570$ fs bzw. $\tau_3 = 5,9$ ps. Gleichzeitig veränderten sich die Amplitudenspektren jedoch kaum. In beiden Fällen waren die Amplituden der schnellsten Komponente deutlich geringer als die der folgenden 510 fs-Komponente.

Aus dem spektralen Verlauf der Amplituden in Abb. 7.2 erkennt man sofort, dass die Dynamik mit $\tau_2=510$ fs den Zerfall des angeregten elektronischen Zustands wiedergibt. Die positive Amplitude um 460 nm entspricht dabei dem Verschwinden der S_1 -Absorption, die negative Amplitude im Bereich von 530 nm bis 660 nm der Repopulation des Grundzustands und dem Rückgang der stimulierten Emission. Auch für die 5 ps-Komponente sind die Ergebnisse eindeutig: Man findet positive Amplituden und damit eine Absorptionsabnahme im Bereich $\lambda_{pr} > 600$ nm und negative Amplituden, d. h. eine Absorptionzunahme, für $\lambda_{pr} < 600$ nm. Dies entspricht dem Übergang zwischen dem gegenüber dem Grundzustand stark rotverschobenen Intermediat J_{600} und dem etwas weniger rotverschobenen Intermediat K_{590} . Insgesamt konnten die Messdaten im Bereich $t_D > 200$ fs durch das Ratenmodell mit vier Zeiten hervorragend beschrieben werden.

7.2 Sensorrhodopsin II (sSRII und pSRII)

In Abb. 7.3 sind die gemessenen Absorptionsänderungen von pSRII und sSRII dargestellt. Der besseren Übersicht halber sind in Abb. 7.5 zusätzlich transiente Spektren beider Proben bei Verzögerungszeiten von 200 fs, 500 fs, 1 ps, 5 ps und 100 ps gezeigt. In Abb. 7.4 finden sich außerdem transiente Spektren von sSRII zu sehr frühen Verzögerungszeiten. Die Messungen wurden in zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen durchgeführt, die nach den in Abschnitt 6.2.1 beschriebenen Korrekturen zusammengefügt wurden. Dabei waren die im langwelligeren Spektralbereich (480 nm bis 710 nm) aufgenommenen Daten von erheblich besserer Qualität als die im blauen Bereich (400 nm bis 540 nm), was vor allem durch die größere Stabilität des mit 800-nm-Impulsen erzeugten Abtastweißlichts zurückzuführen ist.

¹Den Amplituden von τ_1 kommt keine physikalische Bedeutung zu, da die Daten erst ab Verzögerungszeiten von 200 fs angepasst wurden. In den Abbildungen wurden die entsprechenden Amplitudenspektren daher weggelassen.

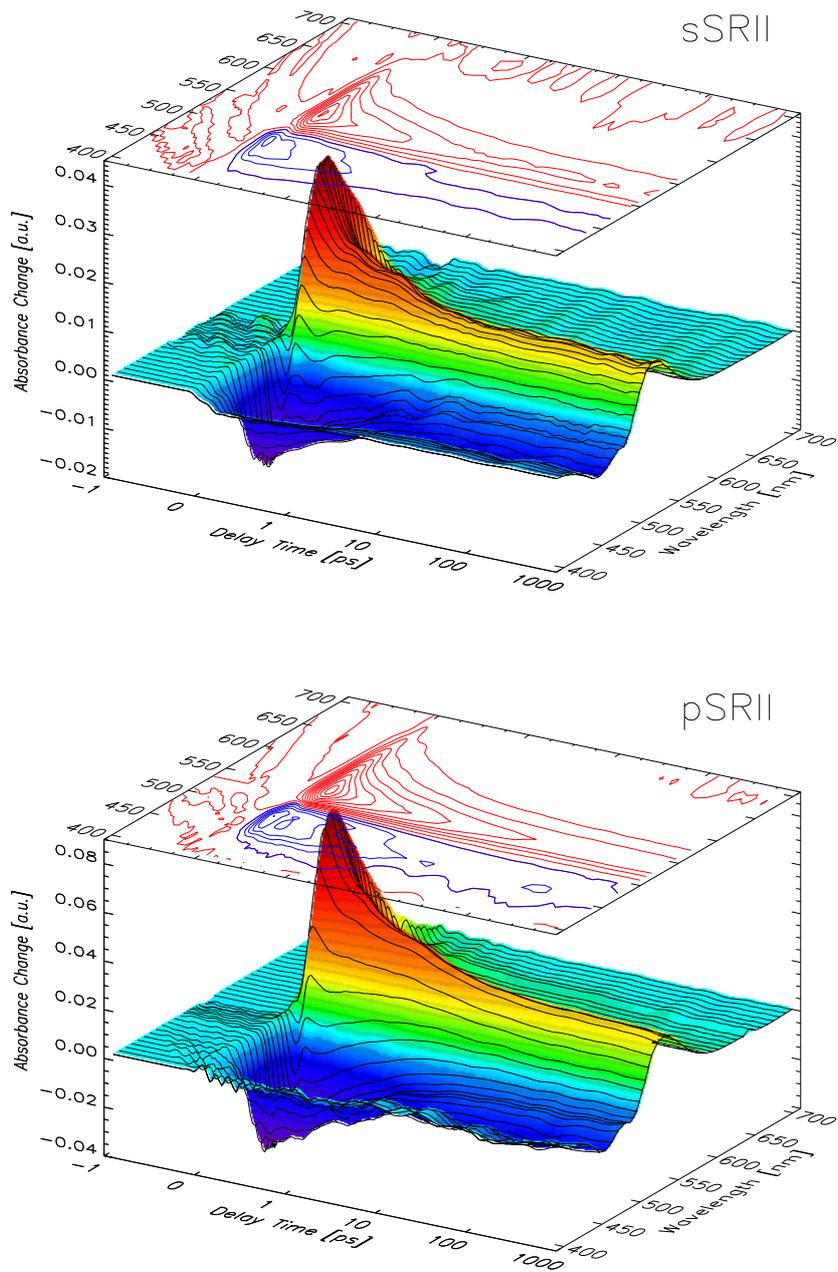


Abbildung 7.3: Transiente Absorptionsänderung von sSRII (oben) und pSRII (unten) nach Anregung mit Pumpimpulsen der Wellenlänge 490 nm. Der Zeitbereich bis 1 ps ist linear, der Bereich von 1 ps bis 1000 ps logarithmisch dargestellt.

Auf den ersten Blick fällt auf, dass beide Proteine über den gesamten gemessenen Spektral- und Zeitbereich praktisch das gleiche Verhalten zeigen. Als deutlichsten Un-

terschied zwischen beiden Proben erkennt man in Abb. 7.5 eine Verschiebung der Differenzspektren von pSRII um ca. 10 nm gegenüber den entsprechenden Daten von sSRII (siehe Abb. 7.5), die die leicht unterschiedlichen Maxima der Grundzustandsabsorption (497 nm bei pSRII, 487 nm bei sSRII) widerspiegelt. Wegen der großen Ähnlichkeit werden im Folgenden zunächst nur die Ergebnisse der Messungen an sSRII besprochen, wobei alle Aussagen analog auch für pSRII gelten.

Im Spektralbereich von 400 nm bis ca. 500 nm beobachtet man eine instantane Abnahme der Absorption nach Lichtanregung, die auf ein Ausbleichen des elektronischen Grundzustands hinweist, der ca. zwischen 400 nm und 520 nm absorbiert (siehe Abb. 6.2). Bereits bei Wellenlängen $\lambda > 500$ nm wird dieser Effekt aber von der ebenfalls instantan einsetzenden Absorption des elektronisch angeregten Zustands übertroffen, so dass hier die Signale unmittelbar nach dem Zeitnullpunkt ein positives Vorzeichen besitzen. Auch außerhalb der Grundzustandsbande (540 nm - 650 nm) sieht man eine unmittelbar nach dem Zeitnullpunkt einsetzende Absorption. In diesem Bereich sollte aber auch stimulierte Emission eine Rolle spielen, die ähnlich wie im Fall von pSRII auch bei sSRII bei ca. 600 nm maximal sein sollte (siehe Fluoreszenzspektrum von pSRII in Abb. 4.3).

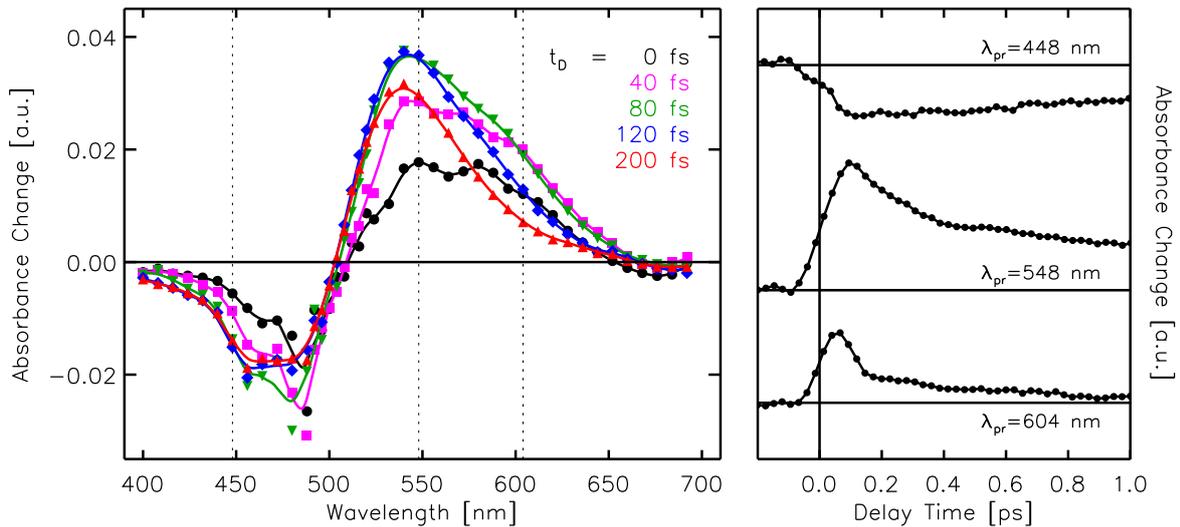


Abbildung 7.4: Schnellste Änderungen der transienten Absorption von sSRII nach der Anregung ($\lambda_{pu}=490$ nm). Links: Transiente Spektren bei verschiedenen Verzögerungszeiten t_D . Rechts: Transienten im Zeitbereich bis 1 ps bei den Abtastwellenlängen 448 nm, 548 nm und 604 nm. Diese Wellenlängen sind im linken Teil durch gestrichelte Linien markiert.

Im linken Teil von Abb. 7.4 sind wieder transiente Spektren zu Verzögerungszeiten $t_D \leq 200$ fs dargestellt. Im Wellenlängenbereich von 400 nm bis ca. 550 nm ist eine eindeutige Aussage über spektrale Verschiebungen der S_1 -Absorption schwierig, nicht zuletzt weil der spektrale Verlauf der Excited-State-Absorption nicht genau bekannt ist und sich teilweise mit der Absorption des Grundzustands und dem möglichen Be-

reich für Emission überlappt. Ein Maximum der Absorption findet man bei ca. 540 nm. Da die Grundzustandsabsorption von sSRII schon bei etwa 530 nm fast verschwindet (siehe Abb. 6.2) sollte es sich dabei tatsächlich um ein Maximum der Excited-State-Absorption handeln. Während der ersten 120 fs kann man eine leichte Blauverschiebung des Maximums (von ca. 550 nm auf 540 nm) beobachten. Am Nulldurchgang der Absorptionsänderung bei ca. 500 nm befindet man sich dann bereits in der blauen Flanke dieser Absorptionsbande. Die Nulldurchgänge zeigen eine kleine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen innerhalb der ersten 120 fs, was ebenfalls mit einer Blauverschiebung der Bande erklärt werden könnte. Im Bereich der Anregungswellenlänge (460 nm bis 490 nm) ist das Signal-Rauschverhältnis reduziert und zu noch kürzeren Wellenlängen werden die Signale sehr klein, so dass dort eine Trennung zwischen verschiedenen Anteilen erschwert ist. In der Transiente bei $\lambda_{pr}=448$ nm kann lediglich eine schnelle Abnahme der Absorption innerhalb der ersten 120 fs beobachtet werden. Auch bei $\lambda_{pr}=548$ nm beobachtet man den Anstieg der Absorption innerhalb dieser Zeitspanne.

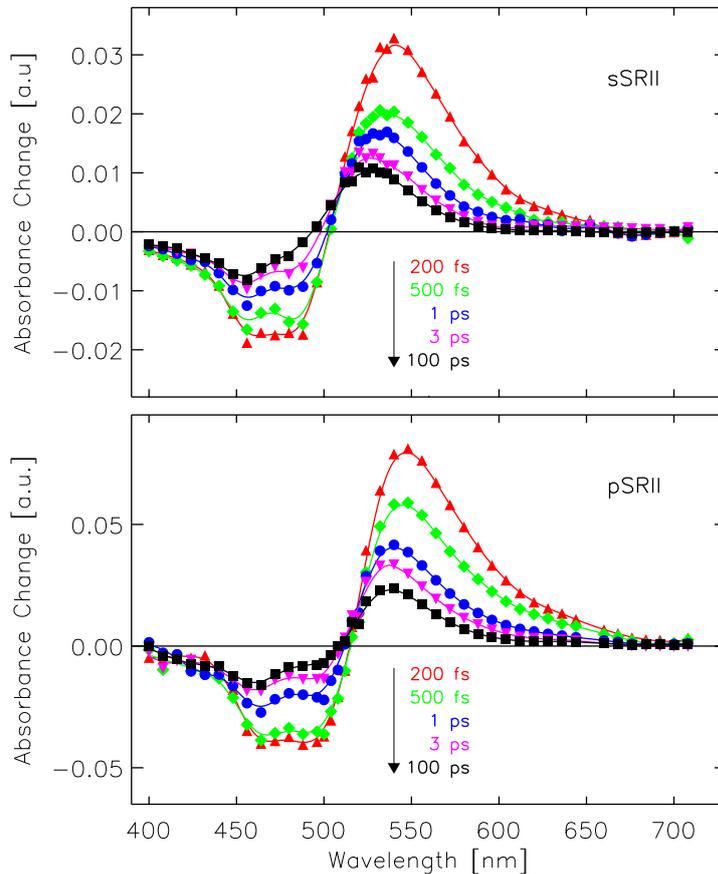


Abbildung 7.5: Transiente Spektren von sSRII (oben) und pSRII (unten).

Im Spektralbereich von 570 nm bis 650 nm kann dagegen eindeutig eine zusätzliche schnelle Kinetik beobachtet werden, die sich in den transienten Spektren in einer Verände-

rung der Form der Differenzspektren innerhalb der ersten 120 fs widerspiegelt. Am Zeitnullpunkt beobachtet man bei ca. 580 nm ein zweites Maximum bzw. eine deutlich ausgeprägte Schulter, die während der Verschiebung des Hauptmaximums verschwindet. Diese spektralen Verschiebungen können sowohl in der stimulierten Emission als auch in der Absorption des angeregten Zustands erfolgen. Bei ca. 600 nm befindet man sich in der roten Flanke der S_1 -Absorption, während die Emission hier in etwa ihr Maximum erreichen sollte. Eine Verschiebung des Emissionsspektrums sollte sich daher hier viel weniger bemerkbar machen als eine Verschiebung des S_1 -Absorptionsspektrums. In der transienten Absorption bei 604 nm sieht man nach dem Anstieg eine schnelle Abnahme des Signals innerhalb der ersten 150 fs, was auf eine Blauverschiebung des Spektrums hindeutet.

Im weiteren Verlauf der Primärreaktion beobachtet man ähnlich wie bei BR eine schnelle Zunahme der Absorption im Bereich der Grundzustandsbande und gleichzeitig eine Abnahme der S_1 -Absorption ($\lambda > 500$ nm). Nach einer Pikosekunde ist das Spektrum der Probe im Vergleich zum Ausgangszustand noch stark rotverschoben (positives Signal für $\lambda > 500$ nm, negatives Signal für $\lambda < 500$ nm). Dies könnte zum einen daher kommen, dass sich noch ein erheblicher Teil der Moleküle im angeregten Zustand befinden, zum anderen daher, dass zwar alle Moleküle den Grundzustand erreicht haben, dieser aber in Analogie zum J-Intermediat von BR stark rotverschoben ist. In den nächsten Pikosekunden beobachtet man noch eine leichte Blauverschiebung und ab etwa 10 ps sind praktisch keine Änderungen der transienten Absorption mehr zu erkennen. Im Unterschied zu sSRII zeigen die Messdaten von pSRII jedoch noch eine geringfügige Änderung der Absorption im Zeitbereich $t_D > 10$ ps. Die nach 1 ns verbleibenden Absorptionsänderungen weisen klar auf die Bildung eines rotverschobenen K-ähnlichen Intermediates hin (SRII₅₃₀, siehe Abb. 2.4)

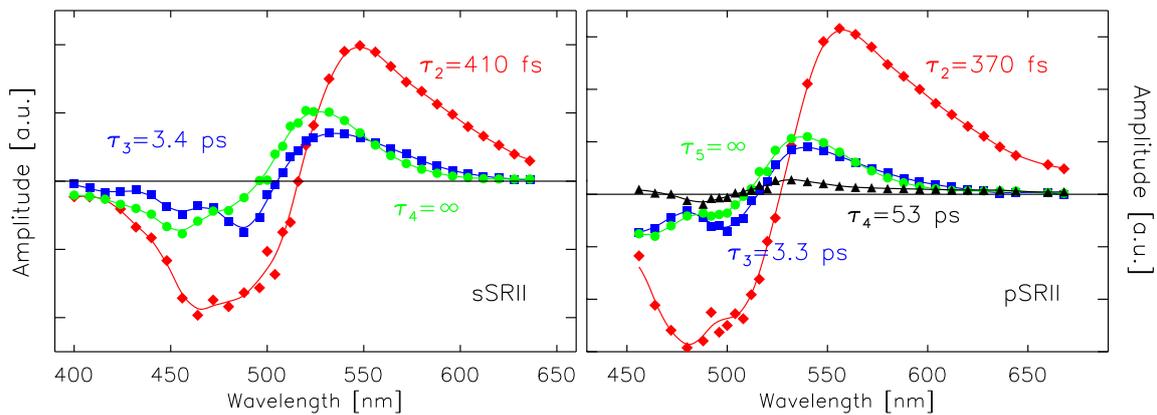


Abbildung 7.6: Amplitudenspektren von sSRII (links) und pSRII (rechts). Die Amplituden für $\tau_1 = 100$ fs sind nicht gezeigt.

Die Anpassung der Daten mit Hilfe eines Ratenmodells wurde für sSRII und pSRII

analog zu der für BR angewandten Prozedur durchgeführt. Wieder wurden die Daten nur für Verzögerungszeiten $t_D > 200$ fs angepasst, wobei vier Zeitkonstanten τ_1 bis τ_4 verwendet wurden. Hält man $\tau_1 = 100$ fs und $\tau_4 = \infty$ fest, so liefert der Algorithmus bei verschiedenen Startwerten als Ergebnis $\tau_2 = 410$ fs und $\tau_3 = 3.4$ ps für sSRII. Die entsprechenden Amplitudenspektren sind im linken Teil von Abb. 7.6 gezeigt. Eine Vergrößerung von τ_1 auf 200 fs führte in diesem Fall zu einer großen Instabilität des Algorithmus und einer Verschlechterung der Anpassung. Verkleinerung von τ_1 auf 50 fs änderte praktisch nichts an den gezeigten Ergebnissen. Die Amplituden der schnellsten Zeit $\tau_1 = 100$ fs waren in etwa vergleichbar mit den Amplituden zu τ_2 und damit erheblich größer als bei BR, was auf grössere nichtexponentielle Anteile in den Signalen hindeutet.

Insgesamt sieht man im Zeitbereich bis ca. 1 ps kleine aber deutliche Abweichungen der Daten gegenüber dem Modell, die ein nichtexponentielles Verhalten der transienten Absorption belegen. Nichtexponentielle, oszillatorische Anteile im Zeitbereich bis 500 fs wurden auch bei Einzelkanalmessungen, die mit höchster Zeitaufösung (35 fs) am Lehrstuhl durchgeführt wurden, beobachtet [88].

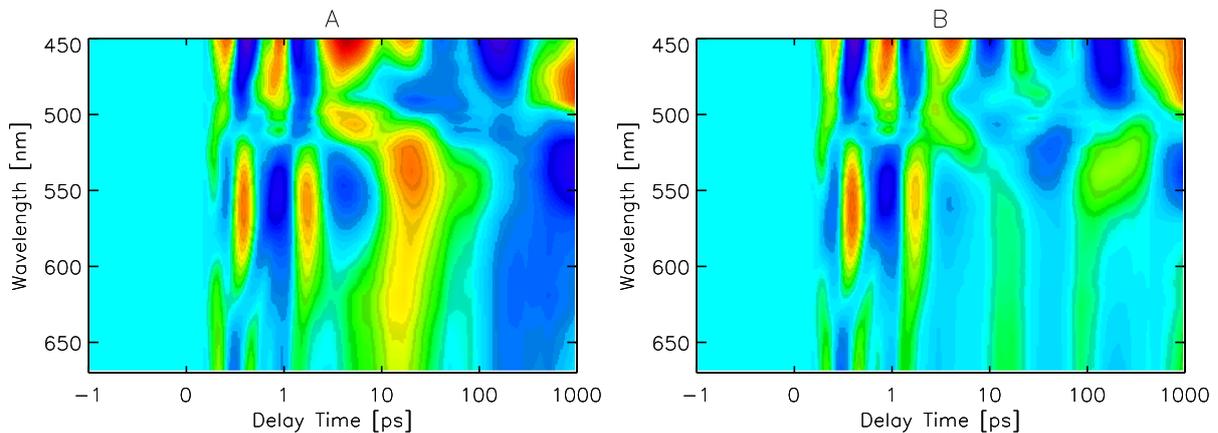


Abbildung 7.7: Residuen der multiexponentiellen Anpassung der pSRII-Daten im Spektralbereich von 450 nm bis 670 nm. Der Zeitbereich bis 1 ps ist linear, der Bereich von 1 ps bis 1000 ps logarithmisch dargestellt. In den roten Gebieten ist die Differenz von Daten und Fit positiv, in den blauen negativ. A: Anpassung mit vier Zerfallskinetiken, B: fünf Zerfallskinetiken. Einzelheiten siehe Text.

Auch im Fall von pSRII wurde die Datenanpassung zunächst mit vier exponentiellen Zerfällen durchgeführt. Dabei ergaben sich $\tau_2 = 430$ fs und $\tau_3 = 5.9$ ps. Die bereits erwähnten Änderungen im Zeitbereich $t_D > 10$ ps führen jedoch zu sehr kleinen, aber deutlich erkennbaren Abweichungen zwischen Modell und Daten. Daher wurde in diesem Zeitbereich eine weitere Zeitkonstante eingeführt. Die beste Anpassung ergab für diese den Wert $\tau_4 = 53$ ps. Durch die zusätzliche Kinetik verschieben sich die Zeiten τ_2 und τ_3 wieder zu kleineren Werten, so dass sie besser den Ergebnissen für sSRII entsprechen.

Die Residuen für beide Anpassungsrechnungen sind in Abb. 7.7 dargestellt. Man erkennt, dass im Zeitbereich von 1 ps bis 1 ns die Fehler der Anpassung durch die Einführung von τ_4 erheblich geringer werden. Die Amplitudenspektren dieser Datenanpassung sind im rechten Teil von Abb. 7.6 dargestellt. Wie bei sSRII zeigt sich auch bei dieser Probe, dass innerhalb der ersten 1 ps ein deutlich nichtexponentielles Verhalten der transienten Absorption auftritt (siehe Abb. 7.7 rechts).

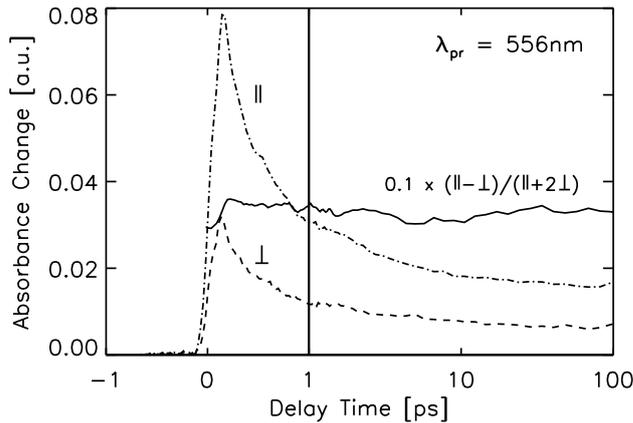


Abbildung 7.8: Transienten von pSRII bei $\lambda_{pr} = 556$ nm für parallele und senkrechte Polarisationsgeometrie und Anisotropie nach Gl. 6.9 (mit Faktor 0,1 skaliert). Der Zeitbereich bis 1 ps ist linear, der Bereich von 1 ps bis 100 ps logarithmisch dargestellt.

Sowohl für sSRII als auch für pSRII wurden die Messungen im roten Spektralbereich bei paralleler und bei senkrechter Polarisationsgeometrie durchgeführt. Sieht man von der Signalhöhe ab, so unterscheiden sich bei beiden Proben die Transienten bei senkrechter Geometrie praktisch nicht von den bei paralleler Geometrie aufgenommenen Kurven. In Abb. 7.8 sind als Beispiel die an pSRII bei $\lambda_{pr} = 556$ nm aufgenommenen Transienten und die daraus mit Hilfe von Gl. 6.9 berechnete Anisotropie aufgetragen. Im Rahmen der Messgenauigkeit sind im Verlauf der Anisotropie keine Kinetiken zu beobachten, wenn man von kleinen Effekten in den ersten 200 fs absieht, die aber auch durch kleinere Fehler bei der Nullpunktsbestimmung und der Lösungsmittelkorrektur herrühren können. Die berechnete Anisotropie erreicht mit ca. 0.35 nicht ganz den theoretischen Wert von 0.4 in Abwesenheit von Änderungen der Übergangsmomente. Die Abweichung ist jedoch im Rahmen der üblichen Schwankungen der Signalhöhen zwischen aufeinanderfolgenden Messserien verständlich. Die Änderungen der Übergangsdipolmomente bei Übergängen zwischen den verschiedenen Zuständen der Moleküle sollten daher zumindest für sSRII und pSRII klein sein. An BR wurden ebenfalls bereits polarisationsabhängige Messungen durchgeführt [72], bei denen keine Änderung des Übergangsmoments für den Übergang BR→K beobachtet werden konnte.

7.3 Sensorrhodopsin I (sSRI)

Die Messdaten zu sSRI wurden in einer Messserie im Wellenlängenbereich von 450 nm bis 720 nm aufgenommen. Die gemessenen Absorptionsänderungen sind in Abb. 7.9 dargestellt. Außerdem finden sich in den Abbildungen 7.10 und 7.11 die transienten Spektren und einige ausgewählte Transienten.

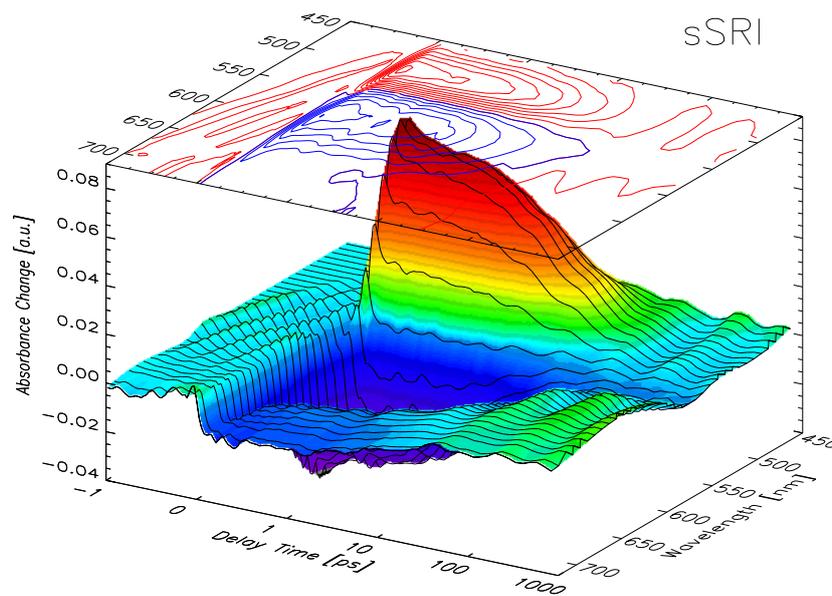


Abbildung 7.9: Transiente Absorptionsänderung von sSRI nach Anregung mit Pumpimpulsen der Wellenlänge 560 nm. Der Zeitbereich bis 1 ps ist linear, der Bereich von 1 ps bis 1000 ps logarithmisch dargestellt. Beachte: Die Wellenlängenskala ist im Vergleich zu Abb. 7.3 umgekehrt.

Die Hauptabsorptionsbande des elektronischen Grundzustands von sSRI hat ihr Maximum bei ca. 585 nm (siehe Abb. 6.2). Wie erwartet sieht man auch bei dieser Messung ein instantanes Einsetzen der Excited-State-Absorption auf der blauen Seite der Grundzustandsbande zwischen 450 nm und 520 nm unmittelbar nach Lichtanregung. Im Bereich der Grundzustandsbande erhält man zunächst eine instantane Abnahme der transienten Absorption ($530 < \lambda_{pr} < 620$). Schon auf den ersten Blick erkennt man die großen Unterschiede zu den Ergebnissen der Messungen an den anderen Retinalproteinen. Nach einer anfänglichen schnellen Dynamik innerhalb der ersten 150 fs sieht man im weiteren Verlauf bei Verzögerungszeiten bis etwa 2 ps nur sehr wenig Veränderung in den Signalen.

Das Maximum der Absorption liegt bei ca. 500 nm und damit ähnlich wie bei BR außerhalb der Hauptabsorptionsbande des Grundzustands, so dass Ausbleichen und Excited-State-Absorption gut zu unterscheiden sind. Wie im Fall von BR zeigen die transienten Spektren zu Verzögerungszeiten $t_D < 200$ fs (Abb. 7.10 links) deutlich eine Blauverschiebung der S_1 -Absorption innerhalb der ersten 120 fs. Wenn sich das Excited-State-Spektrum nach der Anregung zu kürzeren Wellenlängen verschiebt, sollte der Anstieg bei 472 nm nur zum Teil instantan erfolgen. Bei $\lambda_{pr} = 472$ nm (Abb. 7.10 rechts) sieht man einen Anstieg der transienten Absorption innerhalb von ca. 150 fs, danach ändert sich die Absorption in der ersten Pikosekunde kaum. Zwar scheint der Anstieg der Transiente etwas verlangsamt, dies könnte aber auch darauf zurückzuführen sein, dass die Zeitauflösung in diesem Wellenlängenbereich schlechter war. Bei $\lambda_{pr} = 536$ nm dagegen sieht man innerhalb der ersten 100 fs eindeutig einen Anstieg und die anschließende Abnahme der Absorption, die auf die Blauverschiebung des angeregten Zustands hindeutet.

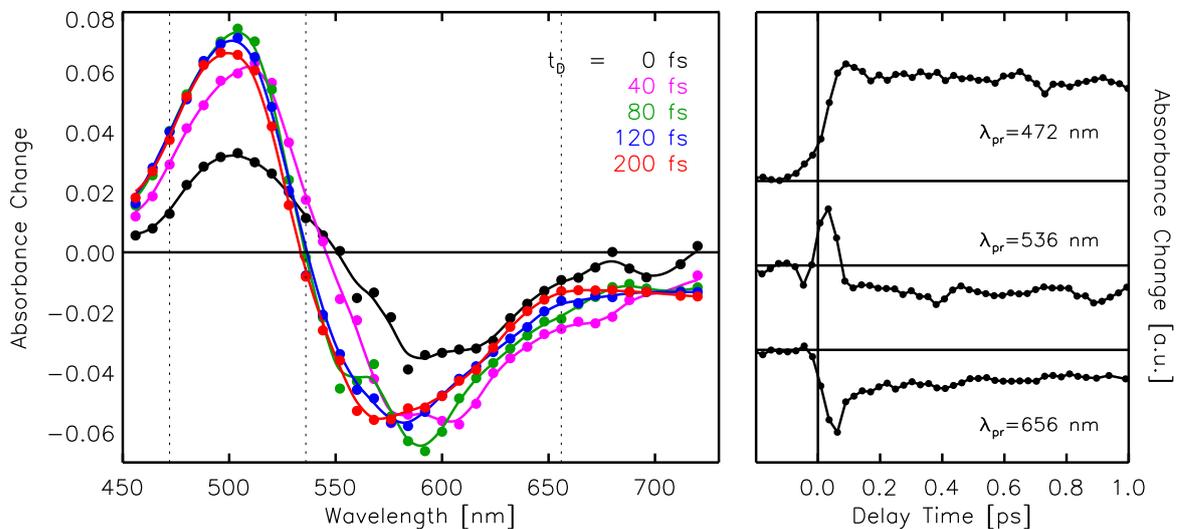


Abbildung 7.10: Schnellste Änderungen der transienten Absorption von sSRI nach der Anregung ($\lambda_{pu} = 560$ nm). Links: Transiente Spektren bei verschiedenen Verzögerungszeiten t_D . Rechts: Messdaten im Zeitbereich bis 1 ps bei den Abtastwellenlängen 472 nm, 536 nm und 656 nm.

Im Bereich zwischen 650 nm und 680 nm sollte das Ausbleichen des Grundzustands keine Rolle mehr spielen. Bei 656 nm beobachtet man eine schnelle Absorptionsabnahme nach der Anregung (siehe Abb. 7.10 links), d.h. die stimulierte Emission ist hier bereits deutlich stärker als eine möglicherweise vorhandene Absorption des angeregten Zustands. Innerhalb der ersten 100 fs steigt das Signal deutlich wieder an. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine schnelle Rotverschiebung des Spektrums der stimulierten Emission innerhalb dieser Zeitspanne.

Im weiteren Verlauf der Primärreaktion (siehe Abb. 7.11) beobachtet man einen im Vergleich zu den anderen gemessenen Proben extrem langsamen Rückgang der Excited-

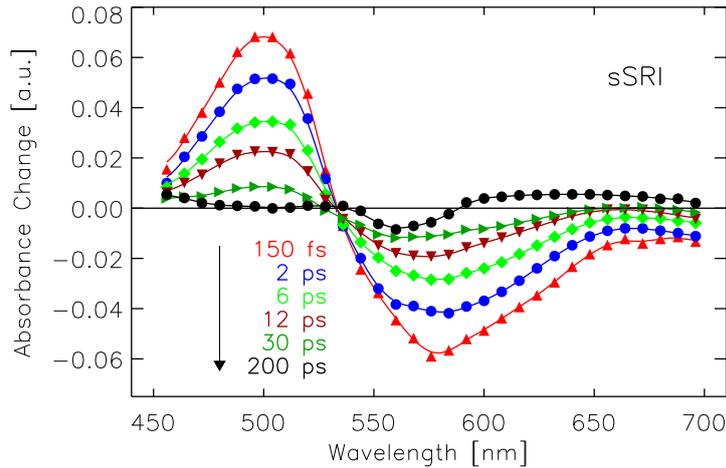


Abbildung 7.11: Transiente Spektren von sSRI im Zeitbereich von 150 fs bis 200 ps.

State-Absorption (im Bereich um $\lambda = 500$ nm) auf der Zeitskala von einigen Pikosekunden. Sieht man von den ersten sehr schnellen spektralen Verschiebungen ab, so kompensieren sich bei ca. 533 nm die Absorption des angeregten Zustands und das Ausbleichen des Grundzustands zu allen Zeiten (isosbestischer Punkt). Im Bereich von $\lambda > 533$ nm nimmt die Absorption ebenfalls auf der Pikosekundenzeitskala wieder zu. Auch hier beobachtet man vor allem die Wiederbesetzung des Grundzustands und die damit verbundene Absorptionzunahme sowie das Verschwinden der stimulierten Emission. Die zu sehr langen Verzögerungszeiten verbleibenden Änderungen sind bei sSRI im Vergleich zu den anderen Proben relativ klein. Der spektrale Verlauf dieser Änderungen (siehe Differenzspektrum bei 200 ps in Abb. 7.11) deutet aber auch hier auf die Bildung eines rotverschobenen Intermediats hin. Dabei sollte es sich um den Zwischenzustand SRI_{610} handeln (siehe Abb. 2.4). Die geringe Änderung im Differenzspektrum ist dabei eventuell teilweise mit der niedrigeren Quantenausbeute für das Erreichen dieses Intermediates von 40% zu erklären (gegenüber 50% bei SR II und 64% bei BR). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre eine geringere Rotverschiebung dieses Zustands gegenüber dem Ausgangszustand.

Die Ergebnisse einer Anpassung der Messdaten mit einem Ratenmodell sind in Abb. 7.12 gezeigt. Eine erste Rechnung mit drei exponentiellen Zerfällen mit den Zeitkonstanten τ_1 , τ_2 und τ_3 , wobei $\tau_1 = 100$ fs und $\tau_3 = \infty$ festgehalten wurden und die Daten wie bei den anderen Proben nur für $t_D > 200$ fs angepasst wurden, lieferte für τ_2 den Wert 9.9 ps. Allerdings waren im Zeitbereich von 2 ps bis 100 ps noch deutliche Abweichungen der bestmöglich angepassten Modellkurven gegenüber den Messdaten zu sehen. Bei eingehender Betrachtung dieser Unterschiede zeigte sich, dass eine genauere Anpassung der einzelnen Transienten stets möglich war, wenn eine weitere exponentielle Kinetik eingeführt wurde. Solche unabhängig durchgeführten Fits einzelner Kurven ergaben für die beiden freien Zeiten Werte im Bereich von 4-6 ps bzw. 20-35 ps. Eine daraufhin ebenfalls

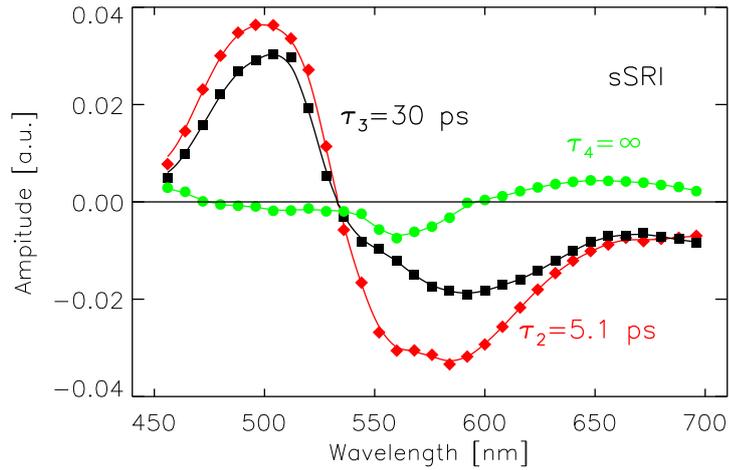


Abbildung 7.12: Amplitudenspektren von sSRI. Einzelheiten siehe Text.

mit 4 exponentiellen Kinetiken durchgeführte globale Anpassung der Daten lieferte die Werte $\tau_2 = 5.1$ ps und $\tau_3 = 30$ ps. Die zu diesen beiden Zeiten gehörigen Amplitudenspektren zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Insbesondere verschwinden beide Amplituden bei 533 nm, was genau der Wellenlänge des isosbestischen Punktes entspricht.

8 Diskussion

8.1 Übersicht der ermittelten Zeitkonstanten

Tabelle 8.1 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der in Kapitel 7 beschriebenen Anpassung der Messdaten der untersuchten Retinalproteine. Zum Vergleich sind auch die nach dem in Kapitel 4 beschriebenen Verfahren aus den Absorptions- und Fluoreszenzspektren errechneten S_1 -Lebensdauern angegeben. Es zeigt sich, dass die gewonnenen Abschätzungen den gemessenen Zeiten doch recht nahe kommen und zumindest ein ungefährer Vergleich der Lebensdauern nach der vorgestellten Methode für Proben, bei denen noch keine Ultrakurzzeitmessungen vorliegen, durchaus sinnvoll sein kann. Dieses Verfahren würde sich insbesondere für systematische Untersuchungen an genetisch manipulierten Retinalproteinen anbieten, um erste Aufschlüsse über die Geschwindigkeit der Isomerisierungsreaktion zu erhalten.

Probe	λ_{pr} [nm]	Zeitkonstanten			S_1 - Lebensdauer nach Tab. 4.1
		im S_1	$S_1 \rightarrow S_0$	im S_0	
BR	560	$\tau_1=0,1$ (fest)	$\tau_2=0,51$	$\tau_3=5,0$	0,82
sSR II	490	$\tau_1=0,1$ (fest)	$\tau_2=0,41$	$\tau_3=3,4$	
pSR II	490	$\tau_1=0,1$ (fest)	$\tau_2=0,37$	$\tau_3=3,3$ $\tau_4=53$	0,75
sSRI	560	$\tau_1=0,1$ (fest) $\tau_1=0,1$ (fest)	$\tau_2=9,9$ (monoexp.) $\tau_2=5,1$ (biexp.) $\tau_3=30$		8,9

Tabelle 8.1: Ergebnisse der Datenanpassungen für BR, sSR II, pSR II und sSRI. Alle Zeitkonstanten sind in Pikosekunden angegeben. Einzelheiten zu den multiexponentiellen Anpassungen sind in Kapitel 7 beschrieben.

8.2 Die Primärreaktion von Bakteriorhodopsin

Setzt man das in Abschnitt 6.2.2 vorgestellte Modell für die Primärreaktion von BR voraus, so ergeben sich nach Gl. 6.8 die in Abb. 8.1 gezeigten Absorptionsspektren für

die verschiedenen Zustände. Dabei wurde angenommen, dass bei der Messung ca. 5.5% der Moleküle angeregt wurden. Da der tatsächliche Anteil der angeregten Moleküle im Probenvolumen nur sehr ungenau bestimmt werden konnte (siehe Abschnitt 6.1.2) ist diese Zahl zunächst etwas willkürlich. Eine untere Grenze ergibt sich aus der Bedingung, dass die Absorptionsquerschnitte nicht negativ werden dürfen. Dabei muss man allerdings beachten, dass diese Bedingung für den ersten Zustand nur eingeschränkt gilt, da sich das nach Gl. 6.8 berechnete σ_1 aus der Absorption des angeregten Zustands und der stimulierten Emission zusammensetzt. In einem Spektralbereich, in dem die Emission überwiegt kann daher σ_1 auch negativ werden. Insgesamt ergab sich aus den vorliegenden Daten eine untere Grenze für den Anteil der angeregten Moleküle von ca. 4%. Erhöht man den Anteil auf ca. 10% so verschieben sich die Spektren der Intermediate J und K lediglich um ca. 3-5 nm zu kürzeren Wellenlängen, bleiben aber ansonsten relativ unverändert. Die S_1 Absorption um 470 nm wird deutlich geringer, erscheint dafür aber im Bereich der Grundzustandsbande erheblich stärker.

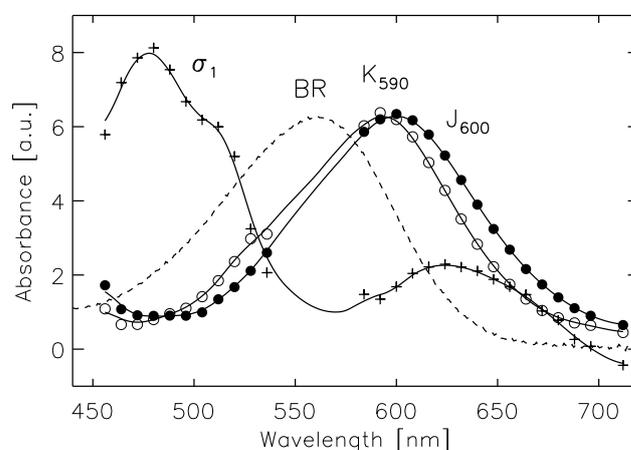


Abbildung 8.1: Absorptionsquerschnitte der Intermediate der Primärreaktion von BR berechnet nach dem in Abschnitt 6.2.2 vorgestellten Modell bei Anregung von 5,5% der Probenmoleküle. Der Absorptionsquerschnitt des ersten Zustands (σ_1) setzt sich aus der Absorption des angeregten Zustands und der stimulierten Emission zusammen.

Die Spektren der Zustände J und K sind, ähnlich dem Grundzustand, breit und unstrukturiert. Die Absorptionsmaxima der Intermediate J und K liegen bei ca. 600 nm bzw. 590 nm, wobei das Maximum von K wegen der fehlenden Daten im Bereich von 540 nm bis 590 nm nicht sehr genau bestimmbar ist. Bei dem gewählten Anregungsverhältnis stimmen die Ergebnisse gut mit den Rechnungen von Polland et al. [73] überein. Auch die gefundenen Zeitkonstante von 510 fs für die Bildung von J_{600} ist in Übereinstimmung mit früheren Messungen [71, 18, 86]. Die Bildung von K_{590} wurde mit 5 ps beobachtet, was dem Wert von Polland et al. [73] entspricht, jedoch wurden für diese Zeit auch Werte um die 3 ps angegeben [18, 71]. Insgesamt kann man aufgrund der Übereinstimmungen mit Literaturdaten davon ausgehen, dass mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Femtosekundspektrometer zuverlässig Absorptionsänderungen im Promillebereich gemessen

werden können.

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit den in Kapitel 3 diskutierten Modellen der Primärreaktion ist die Entwicklung des Spektrums des elektronisch angeregten Zustands und der stimulierten Emission innerhalb der ersten 200 fs. Daher ist zunächst einmal die Form des Spektrums des nach ca. 200 fs “relaxierten” elektronisch angeregten Zustands entscheidend. Nach dem hier vorausgesetzten Ratenmodell entspricht der Absorptionsquerschnitt σ_1 (Pluszeichen in Abb. 8.1) der Summe aus Absorption und Emission dieses Zustands. Neben dem deutlich erkennbaren Absorptionsmaximum bei ca. 475 nm findet man auch auf der roten Seite der Grundzustandsbande Absorption. Da in diesem Bereich auch Emission zu erwarten ist, ist es wahrscheinlich, dass jenseits von 600 nm noch eine zweite, ebenfalls starke Absorptionsbande im angeregten Zustand existiert, die die Emission teilweise verdeckt. Femtosekundenmessungen im nahinfraroten Spektralbereich zeigen negative Absorptionsänderungen am Zeitnullpunkt, die sogar oberhalb von 900 nm noch zunehmend größer werden [32, 45], während auch bereits bei Wellenlängen zwischen 650 nm und 750 nm sehr kurzlebige negative Absorptionsänderungen beobachtet werden können, die als stimulierte Emission interpretiert werden können [18, diese Arbeit]. Gerade im Bereich um 700 nm, in dem das Maximum der Fluoreszenz in Dauerstrichexperimenten liegt, ist kaum stimulierte Emission zu sehen, was darauf hindeutet, dass sich hier Emission und Absorption gegenseitig aufheben. Auch Hasson et al. [35] finden in ihren Messungen Hinweise auf eine solche Absorptionsbande, deren Maximum sie auf etwa 770 nm schätzen. Allerdings wurde in dieser Arbeit das Maximum der negativen Absorptionsänderung im Gegensatz zu den oben zitierten Arbeiten [32, 45] bereits bei etwa 900 nm beobachtet. Detailliertere quantitative Aussagen über die Absorptions- und Emissionsspektren im nahen infraroten Spektralbereich könnten durch weitere, sehr genaue Messungen bei hoher Zeitauflösung bis zu Wellenlängen jenseits der 1000 nm gewonnen werden.

Eindeutiger ist die Interpretation dagegen auf der kurzwelligen Seite der Grundzustandsbande. Aus den in Abb. 7.1 vorgestellten Ergebnissen dieser Arbeit geht klar hervor, dass eine Blauverschiebung der Excited-State-Absorption im Bereich um 470 nm innerhalb der ersten 150 fs nach der Anregung stattfindet. Die S_1 -Potentialfläche sollte daher eine Steigung im Bereich der Franck-Condon-Region aufweisen. Ein mehrdimensionales Reaktionsmodell nach Garavelli et al [28, 29] wie in Abschnitt 3.2 vorgestellt erscheint in diesem Zusammenhang möglich. Genauere Informationen über die an Wellenpaketsbewegungen beteiligten Schwingungsmoden können aus transienten Absorptionmessungen mit deutlich besserer Zeitauflösung abgeleitet werden. Messungen am Lehrstuhl mit einer Zeitauflösung von ca. 30 fs zeigen klar oszillatorische Anteile in der transienten Absorption und gaben erste Hinweise, dass neben der C=C-Streckschwingung auch eine niederfrequenter Mode (HOOP-Schwingung) an den schnellsten Relaxationsprozessen beteiligt sind [45].

8.3 Sensorrhodopsine

Die Primärreaktion der Sensorrhodopsine wurde in der Literatur bisher noch nicht untersucht. Es wurden weder Vergleichsdaten zu den in Kapitel 4 vorgestellten Fluoreszenzmessungen noch zu den ultrakurzzeitspektroskopischen Messungen gefunden. Vor dem Hintergrund der Vielzahl von Arbeiten, die teilweise in Kap. 3 vorgestellten wurden und in denen die Primärreaktion von BR und anderen Retinalproteinen wie HR und einer großen Zahl von Mutanten untersucht wurden, sollen daher im folgenden Abschnitt erste Modellvorstellungen diskutiert werden.

8.3.1 Sensorrhodopsin II

Durch die starke Blauverschiebung der Grundzustandsabsorption gegenüber BR lassen sich bei den SR-II-Proben die Excited-State-Absorption und die Absorption der ersten Intermediate des Photozyklus nur noch schwer trennen. Mit den in dieser Arbeit über einen weiten Wellenlängenbereich aufgenommenen Daten ist trotz dieser Schwierigkeit aber eine gute Charakterisierung der Primärreaktion möglich. Trotz der Überlagerung mit den Produktbanden läßt sich anhand der in den transienten Spektren sichtbaren Excited-State-Absorption und dem Ausbleichen der Grundzustandsbande der Übergang in den elektronischen Grundzustand gut verfolgen und den Zeitkonstanten $\tau_2=410$ fs bzw. $\tau_2=370$ fs zuordnen. Für pSR-II wird diese Interpretation durch Einkanal-Femtosekundenmessungen zusätzlich gestützt, die bei einer Abtastwellenlänge von 890 nm leicht verzögert einsetzende stimulierte Emission zeigen, die ebenfalls mit einer Zeitkonstante von etwa 300-400 fs abklingt [59].

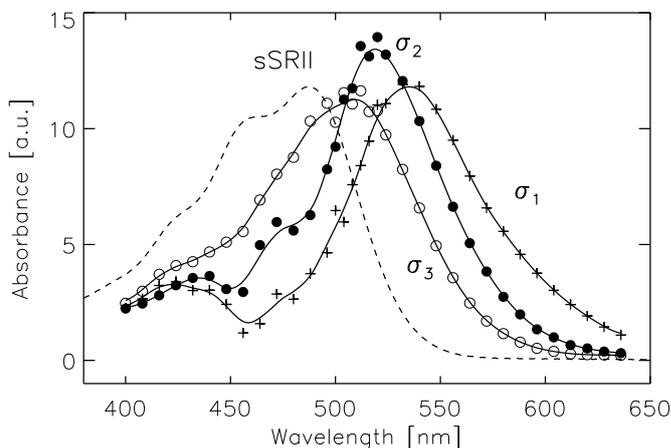


Abbildung 8.2: Absorptionsquerschnitte der Intermediate der Primärreaktion von sSR-II berechnet nach dem in Abschnitt 6.2.2 vorgestellten Modell bei Anregung von 15% der Probenmoleküle. Das Grundzustandsspektrum ist gestrichelt eingezeichnet.

Die weitgehende Ähnlichkeit mit BR sowohl bei den gemessenen Fluoreszenzquantenausbeuten als auch bei den in den Ultrakurzzeitmessungen gefundenen Zeitkonstanten (siehe Tab. 8.1) legen, ungeachtet der riesigen spektralen Verschiebung des Grundzustandspektrums von über 80 nm, einen sehr ähnlichen Verlauf der Primärreaktion nahe.

Eine erste Interpretation der Daten von sSRII und pSRII ist daher mit dem in Abschnitt 6.2.2 für BR vorgestellten Ratenmodell möglich. Hierbei wurde die Quantenausbeute für die Bildung des rotverschobenen K-ähnlichen Intermediats nach den Messungen von Losi et al. [57] an pSRII mit 50% angenommen. Die berechneten Absorptionsquerschnitte für sSRII sind in Abb. 8.2 zu sehen. Der Anteil der angeregten Proteinmoleküle im Anregungsvolumen wurde bei dieser Rechnung auf 15% geschätzt. Eine untere Grenze für diesen Wert erhält man bei ca. 13%, da bei kleineren Werten der Absorptionsquerschnitt σ_1 bei 460 nm negativ wird. Negative Werte in diesem Bereich, in dem sicher keine stimulierte Emission auftritt, sind physikalisch unsinnig. Eine obere Grenze liefert der in Abschnitt 6.1.2 abgeschätzte maximale Anteil der angeregten Moleküle von 20%.

Der Absorptionsquerschnitt σ_1 enthält wieder sowohl Excited-State-Absorption als auch stimulierte Emission, die vor allem in die Form der roten Flanke der gezeigten Bande eingehen dürfte. Die Ergebnisse der Messungen zu sehr kurzen Verzögerungszeiten (siehe Abb. 7.4) belegen eindeutig eine Blauverschiebung der Absorption innerhalb der ersten 120 fs. Analog zu BR kann man also auch bei sSRII von einer abfallenden Potentialfläche im Franck-Condon-Bereich ausgehen, auf der sich das angeregte Wellenpaket schnell nach unten bewegt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung der transienten Absorptionsänderungen oberhalb von 700 nm im Bereich der reinen stimulierten Emission.

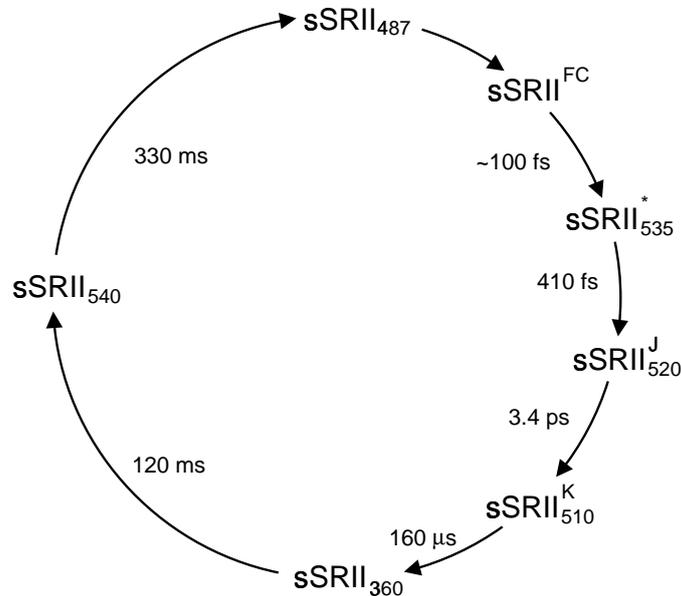


Abbildung 8.3: Erweiterter Photozyklus von sSRII

In Analogie zum BR-Modell entsprechen die Absorptionsquerschnitte σ_2 und σ_3 den Intermediaten J und K. Ihre Absorptionsmaxima liegen bei ca. 520 nm bzw. 510 nm, weshalb sie im Folgenden mit sSRII_{520}^J und sSRII_{510}^K bezeichnet werden. Der Zustand sSRII_{510}^K sollte dem Intermediat SRII_{530} aus Abb. 2.4 entsprechen, das in der Arbeit von Marwan et al. [62] angegeben ist. Allerdings konnte aufgrund der dort angegebenen Referenzen nicht ermittelt werden, wie dieser Zustand charakterisiert wurde. In Tieftemperaturmessungen wurde ein K-ähnliches Intermediat gefunden, das mit P_{520} bezeichnet wurde [48]. Allerdings bezeichnet der Index 520 in diesem Fall das Maximum des Differenzspektrums beim Übergang aus dem Grundzustand in dieses Intermediat. Dieser Wert ist also mit dem Maximum des Differenzspektrums zu sehr langen Verzögerungszeiten (transientes Spektrum bei 100 ps in Abb. 7.5) zu vergleichen, das bei ca. 525 nm liegt. Ein erweiterter Photozyklus von sSRII, der die hier vorgestellten Intermediate enthält, ist in Abb. 8.3 zu sehen.

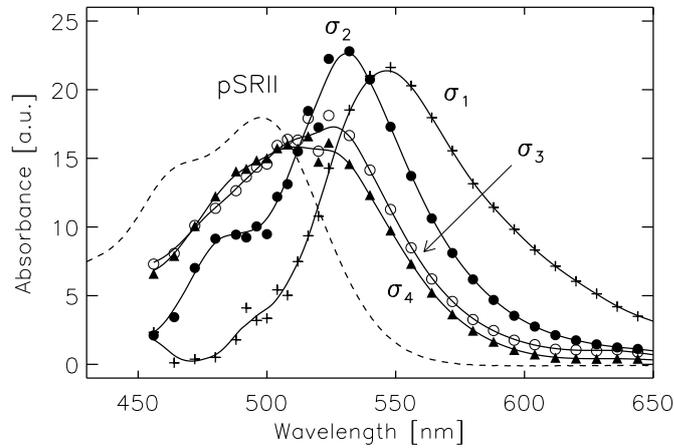


Abbildung 8.4: Absorptionsquerschnitte der Intermediate der Primärreaktion von pSRII berechnet nach dem in Abschnitt 6.2.2 vorgestellten Modell bei Anregung von 23% der Probenmoleküle.

Die berechneten Absorptionsquerschnitte von pSRII sind in Abb. 8.4 gezeigt. Das verwendete Ratenmodell wurde für pSRII einfach um einen vierten Zustand erweitert, der aus dem Zustand 3 über die Rate $k_{43}=(53 \text{ ps})^{-1}$ besetzt wird und dann im weiteren Verlauf des Photozyklus sehr langsam entvölkert wird. Um negative Absorptionsquerschnitte zu vermeiden, musste bei dieser Rechnung der Anteil der angeregten Moleküle mit 23% angenommen werden. Sieht man von dem zusätzlichen Intermediat ab so ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Absorptionsquerschnitte mit den Ergebnissen bei sSRII. Das Maximum von σ_1 befindet sich bei 545 nm. Dieser relaxierte angeregte Zustand ist in dem in Abb. 8.5 gezeigten Photozyklus mit pSRII_{545}^J bezeichnet. Der J-ähnliche Zustand σ_2 liegt bei 530 nm (in Abb.8.5 mit pSRII_{530}^J bezeichnet). Entsprechend der geringen Amplitude der 53 ps-Zeit unterscheiden sich die beiden folgenden Zustände spektral nur sehr geringfügig. Ihre Maxima liegen bei ca. 520 nm (σ_3) und 510 nm (σ_4) und wurden mit den Kürzeln pSRII_{520}^{JK} und pSRII_{510}^K benannt.

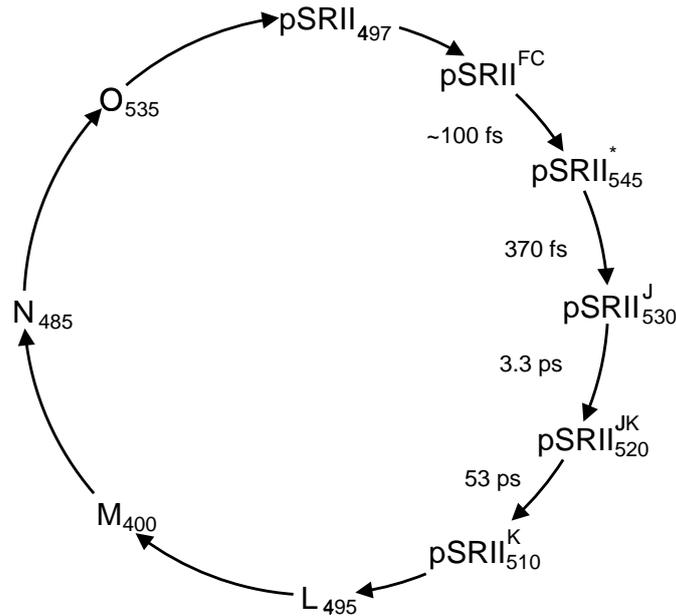


Abbildung 8.5: Erweiterter Photozyklus von pSRII nach den Ergebnissen dieser Arbeit und von Chizhov et al. [14]

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden zusammen mit den von Chizhov et al. [14] in Photolyseexperimenten mit einer Zeitaufösung ca. $1 \mu\text{s}$ beobachteten Intermediaten in dem erweiterten Photozyklus in Abb. 8.5 zusammengefasst. Das Intermediat $\text{pSRII}_{510}^{\text{K}}$ stimmt dabei mit dem von Chizhov et al. gefundenen K-Intermediat überein, dessen Maximum ebenfalls mit 510 nm angegeben wurde. Freilich kann aus den bisherigen Messungen noch keine Schlussfolgerung auf die Natur des Intermediates $\text{pSRII}_{520}^{\text{JK}}$ gezogen werden. Da die beobachteten spektralen Änderungen in diesem Zeitbereich nur knapp überhalb der Rauschgrenze lagen (siehe Abb. 7.7) ist auch nicht sicher, ob es sich überhaupt um eine exponentielle Kinetik handelt. Als Erklärung denkbar wären vor allem durch die Isomerisierung ausgelöste Umordnungsprozesse in der Proteinkette, die auf den Chromophor zurückwirken.

8.3.2 Sensorrhodopsin I

Wie in Abschnitt 7.3 beschrieben, zeigten sich in den transienten Absorptionsmessungen an sSRI nach einer anfänglichen schnellen Kinetik (innerhalb der ersten 150 fs) mit geringer Amplitude ein deutlich biexponentieller Zerfall der Absorptionsänderungen auf der Pikosekunden-Zeitskala. Aus den transienten Spektren und den Amplituden dieser beiden Zeiten (Abb. 7.11 und τ_2 und τ_3 in Abb. 7.12) geht eindeutig hervor, dass beide Prozesse zumindest größtenteils den Zerfall des elektronisch angeregten Zustands widerspiegeln. Dieser biexponentielle und im Vergleich zu BR und SRII sehr langsame Zerfall des angeregten Zustands erinnert zunächst an die in Abschnitt 3.2 vorgestellten

Ergebnisse von HR, BRD85T und PSB, die sich von BR durch das Fehlen einer negativen Ladung an der Position des Gegenions unterscheiden. Analog zu diesen Systemen ist bei der hier gemessenen "blauen" SRI-Probe bei pH6 die entsprechende Aminosäure Asp76 protoniert, so dass auch hier keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Schiffschens Base oder dem Chromophor stattfinden.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass auch bei der blauen Form von BR (acid blue BR) ein langsamer biexponentieller Zerfall des angeregten Zustands beobachtet wird [55]. Dabei handelt es sich um normales BR, das auf einen pH-Wert von 2,0 gebracht wird, wodurch sich das Absorptionsmaximum nach etwa 600 nm verschiebt und Asp85 protoniert wird [65]. Auch dieses Beispiel zeigt also, dass der negativen Ladung des Gegenions ein entscheidender Einfluß auf eine schnelle Rückreaktion in den elektronischen Grundzustand zukommt.

Für die beobachtete Biexponentialität des S_1 -Zerfalls von sSRI kommt allerdings auch noch eine weitere Erklärungen in Betracht: Da der pH-Wert der Probe mit 6,0 relativ nahe an dem pK-Wert von 7 für den Übergang zwischen der protonierten und der deprotonierten Form liegt, könnte ein kleiner Teil der Moleküle in deprotonierter Form vorliegen. Da diese Moleküle zudem bei der eingestellten Anregungswellenlänge von 560 nm mit etwas größerer Wahrscheinlichkeit angeregt werden ($\lambda_{max} = 550$ nm) als die protonierten ($\lambda_{max} = 587$ nm), könnte sich ihre Absorption im Messsignal bemerkbar machen. Gegen diese Erklärung sprechen allerdings die aufgenommenen Dauerstrichspektren der sSRI-Probe (siehe 6.2), die ein Absorptionsmaximum bei 585 nm zeigen, sowie die Tatsache, dass die Amplituden der schnelleren 5 ps-Zeit, die dem Anteil der deprotonierten Moleküle zugeordnet werden müsste, deutlich größer als die zur langsameren Zeitkonstante gehörenden Amplituden sind.

Die Amplituden der beiden Pikosekunden-Zeiten lassen weiterhin vermuten, dass es sich nicht um zwei aufeinanderfolgende spektroskopische Zustände in einem sequentiellen Modell handelt. Ein solches Modell würde zu unrealistischen Absorptionsquerschnitten führen. Für eine erste Interpretation der Daten bietet sich daher ein Modell an, das bereits für den biexponentiellen S_1 -Zerfall von HR vorgeschlagen wurde [2]. Eine schematische Darstellung eines solchen Reaktionsmodells ist in Abb. 8.6 gezeigt.

In diesem Modell findet eine Verzweigung der Reaktionswege direkt nach der Anregung auf der S_1 -Potentialfläche innerhalb der ersten 150 fs in einen reaktiven und einen nichtreaktiven Pfad statt. Das Molekül erreicht mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eines von zwei möglichen Minima auf der Potentialfläche, von denen aus die Rückreaktion in den Grundzustand erfolgt. Von dem nichtreaktiven Zustand (1) aus ist dann lediglich die Reaktion in den *trans*-Grundzustand möglich, während aus dem reaktiven Zustand (2) die *cis*-Konfiguration erreicht werden kann. Es erscheint plausibel, die Wahrscheinlichkeiten für das Erreichen von 1 und 2 gemäß der Größe der Fitamplituden der beiden Pikosekundenzeiten zu wählen. Allerdings ist nicht klar, welche der beiden Zeitkonstanten dem Zerfall des reaktiven Zwischenzustands und welche dem nichtreaktiven zugeordnet werden soll.

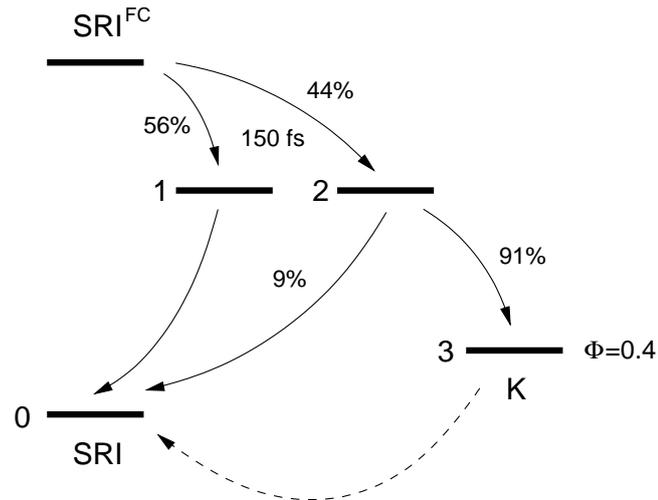


Abbildung 8.6: Ein Ratenmodell für sSRI in Anlehnung an Arlt et al. [2]. Einzelheiten siehe Text.

Weiterhin wurde angenommen, dass der K-ähnliche Produktzustand gemäß Losi et al [56] mit einer Quantenausbeute von 40% erreicht wird. Daher muss noch ein Teil der Moleküle aus Zustand 2 in den *trans*-Grundzustand reagieren. Mit dem in Abschnitt 6.2.2 vorgestellten Formalismus können dann wieder die Absorptionsquerschnitte der Zustände 1-3 berechnet werden. Da die schnelle S_1 -Reaktion (150 fs-Zeit) bei der Datenanpassung nicht berücksichtigt wurde, wurden die Anfangsbedingungen des Ratengleichungssystems so gewählt, dass die Zustände 1 und 2 zur Zeit $t=0$ mit jeweils 56 bzw. 44% der angeregten Moleküle besetzt werden. Der Bruchteil der insgesamt angeregten Moleküle wurde auf 16% festgelegt, da eine geringere Zahl zu negativen Absorptionsquerschnitten bei Wellenlängen um 560 nm führte. Die berechneten Absorptionsquerschnitte sind in Abb. 8.7 gezeigt. Für die Querschnitte σ_1 und σ_2 der beiden elektronisch angeregten Zustände ergeben sich in diesem Modell sehr ähnliche Spektren. Der K-ähnliche Produktzustand (σ_3) hat sein Absorptionsmaximum bei ca. 595 nm nahe dem Literaturwert von 600 nm [10]. Die ‘Delle’ in der blauen Flanke von σ_3 bei 560 nm entspricht wahrscheinlich einem kleinen systematischen Fehler in den Messdaten aufgrund der Streuung von Anregungslicht.

Natürlich ist das hier vorgestellte Modell nur eine von mehreren Möglichkeiten, die an sSRI gemessenen Daten zu interpretieren. Es besteht auch die Frage, ob auch im Laufe der Primärreaktion von sSRI ein J-ähnlicher Zwischenzustand erreicht wird. Bedingt durch die großen Auswirkungen der Relaxation des elektronisch angeregten Zustands in der transienten Absorption, könnte ein weiterer Übergang, der auf einer ähnlichen Zeitskala abläuft, in den Messungen praktisch unentdeckbar bleiben.

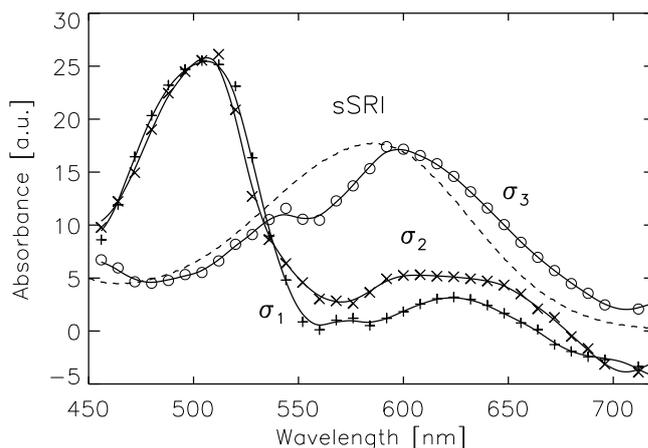


Abbildung 8.7: Absorptionsquerschnitte der Intermediate der Primärreaktion von sSRI bei Anregung von 16% der Probenmoleküle.

8.4 Ein Reaktionsmodell für die Retinalproteine und Ausblick

Im folgenden Abschnitt soll ein qualitatives Modell zur Interpretation der Primärreaktion der Retinalproteine vorgestellt werden, mit dem ein großer Teil der experimentellen Beobachtungen erklärt werden kann. Neben den Ergebnissen dieser Arbeit wird dieses Modell vor allem von neuesten Messungen an BR und BR-D85T [115] sowie den theoretischen Rechnungen von Nonella [66] gestützt.

Die von Nonella an einem PSB-Modellmolekül durchgeführten CASSCF/MRCI-Rechnungen ergaben, dass im Vakuum eine konische Durchschneidung zwischen der S_1 - und der S_0 -Fläche des Moleküls nur über eine *trans*→13,14-di-*cis*-Isomerisierung erreicht wird. Zudem läuft dieser Prozess nicht spontan ab, sondern es muss eine Energiebarriere überwunden werden. Wird dagegen in der Nähe der $=\text{NH}_2^+$ Gruppe der Schiffchen Base ein Gegenion geeignet plaziert, so findet sich auch für die *trans*→13-*cis*-Isomerisierung eine konische Durchschneidung. Diese Isomerisierungsreaktion kann fast barriereelos erfolgen, während die Energiebarriere für die *trans*→13,14-di-*cis*-Isomerisierung auch weiterhin bestehen bleibt. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass die verbleibende kleine Energiebarriere für die *trans*→13-*cis*-Isomerisierung nach einer Relaxierung der Längen von C-C- und C-N-Bindungen im angeregten Zustand völlig verschwindet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ladungsverteilung in der Proteinumgebung des Retinals auf die schnelle *trans*→13-*cis*-Isomerisierung optimiert ist und legen das folgende Reaktionsmodell nahe, das in Abb. 8.8 A dargestellt ist: Unmittelbar nach der Absorption eines Photons startet das System am Franck-Condon-Punkt in einer steilen Region der S_1 -Potentialfläche. Von dort aus erfolgt zuerst eine schnelle Relaxation entlang hochfrequenter Reaktionskoordinaten in den ersten 150 fs. Im Verlauf dieser Relaxation beobachtet man stark gedämpfte oszillatorische Anteile in den Femtosekundenmessun-

gen. Nach dieser Relaxation der C-C- und C-N-Bindungen erreicht das System einen flacheren Bereich auf der S_1 -Fläche und die Bewegung in Richtung der Torsionskoordinate startet. Da im Verlauf der Torsionsbewegung eine konische Durchschneidung leicht erreicht werden kann, findet ein schneller und effizienter Übergang zum Grundzustand statt, der sich in der transienten Absorption beobachteten 500-fs-Kinetik widerspiegelt.

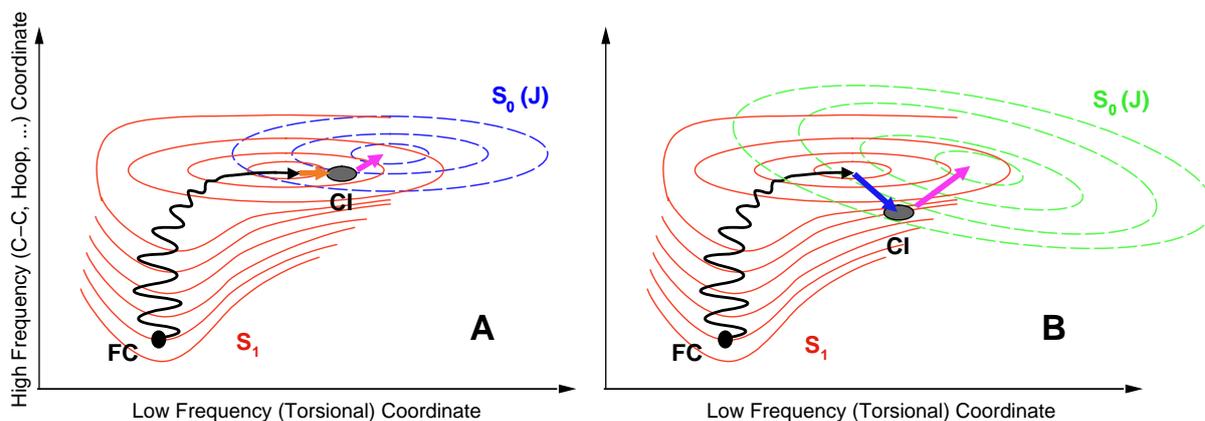


Abbildung 8.8: Potentialflächenmodell der Primärreaktion der Retinalproteine. FC: Franck-Condon-Punkt, CI: Konische Durchschneidung. A: Gut erreichbare konische Durchschneidung → schnelle Reaktion, B: schlecht erreichbare konische Durchschneidung → langsame Reaktion.

Durch eine weniger optimale Ladungsverteilung im Molekül könnte die S_1 -Potentialfläche so beeinflusst werden, dass die konische Durchschneidung im Zuge der Isomerisierung nur noch schlecht zu erreichen ist (Abb. 8.8 B) oder sogar ganz verschwindet. Die Folge ist eine verlangsamte S_1 - S_0 -Reaktion. Eine in Bezug auf die Isomerisierung nicht optimale Ladungsverteilung kann entweder durch einen “willkürlichen” Eingriff durch Mutation wie im Falle von BR-D85T herbeigeführt werden, oder sie könnte aus funktionellen Gründen nötig sein (HR, SRI). Falls eine geänderte Ladungsverteilung zur Realisierung einer gewünschten biologischen Funktion (Chloridpumpe, Sensor) führt, könnten im Zuge der Evolution im Gegenzug dafür Vorteile, die eine schnelle und effizientere Primärreaktion bietet, teilweise geopfert worden sein. Gerade bei den Sensoren erscheint eine solche Strategie sinnvoll, da bei ihnen die Reaktionsquantenausbeute nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Erstaunlich dagegen ist, dass gerade im Fall des Photosensors SRII die Primärreaktion so extrem schnell und effektiv abläuft. Die grosse Verschiebung der Grundzustandsabsorption von SRII gegenüber BR läßt vermuten, dass sich die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinumgebung und Chromophor stark verändern. Die Primärreaktion scheint jedoch von der Verschiebung der Grundzustandsbande kaum beeinflusst. Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass der Opsin-Shift und die Geschwindigkeit der Primärreaktion durch zwei unabhängige Mechanismen gesteuert werden.

Die beobachtete Biexponentialität des S_1 -Zerfalls von SRI und HR kann in diesem Modell wie bereits erwähnt durch eine Bifurkation des Reaktionsweges auf der S_1 -Fläche dargestellt werden. Allerdings sind auch andere Erklärungen denkbar. Erwähnt seien hier nur klassische Diffusionsmodelle, die bereits im Zusammenhang mit Femtosekundenmessungen an PSB (protonierte Schiff-Base des Retinals) diskutiert wurden (siehe [31] und Referenzen darin).

Auch das hier vorgestellte Modell bietet allerdings noch keine schlüssige Erklärung für die bisher vorliegenden Messdaten im Bereich der stimulierten Emission von BR [35, 32, 45]. Wie bereits erwähnt zeigt sich, dass auch bei Messungen bis zu Abtastwellenlängen von ca. 1000 nm allerhöchstens sehr kleine Verzögerungen im Einsetzen der stimulierten Emission von bis zu 50 fs beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die stimulierte Emission nicht nur in den schwingungsrelaxierten Grundzustand sondern auch Emission in einen Triplettzustand oder in Obertöne oder Kombinationen von hochfrequenten Schwingungszustände des elektronischen Grundzustands erfolgt (siehe [45]).

Spektral aufgelöste Anreg-Abtast-Messungen sollten in diesem Zusammenhang auch bei der weiteren Klärung der noch offenen Fragen eine wichtige Rolle spielen, da nur sie die Möglichkeit bieten, das komplexe spektrale Verhalten der Excited-State-Absorption und der Emission zu verstehen. Durch weitere konsequente Verbesserungen des hier vorgestellten Versuchsaufbaus ist es erst kürzlich gelungen, Kreuzkorrelationsbreiten von ca. 20 fs im sichtbaren Spektralbereich zu erreichen [42]. Entscheidende Verbesserung werden dabei durch den Einsatz von Weißlicht erreicht, dass in CaF_2 erzeugt wird [43]. Durch den Erzeugung von CaF_2 -Weißlicht als Abtastlicht kann ausserdem der Spektralbereich der Messung erheblich erweitert werden, so dass Messungen auf beiden Seiten weit ausserhalb der Grundzustandsbanden der Retinalproteine von ca. 320 nm bis 960 nm möglich werden. Zudem ermöglicht die Weiterentwicklung der Lasertechnik eine laufend bessere Stabilität der Anreg- und Abtastpulse. Eine bessere Stabilität und Handhabbarkeit der experimentellen Anordnung sollte es auch ermöglichen, Abhängigkeiten der Kinetik von verschiedenen Parametern wie Anregungswellenlänge oder Temperatur zu studieren.

9 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die primären Photoreaktionen von Retinalproteinen aus den Archaeobakterien *Halobacterium salinarum* und *Natronobacterium pharaonis* mit Hilfe von Anreg-Abtastmessungen mit einer Zeitauflösung von ca. 100 fs über den gesamten sichtbaren Spektralbereich sowie mit Dauerstrich-Fluoreszenzmessungen charakterisiert. Zur Durchführung der Kurzzeitmessungen wurde ein Femtosekunden-Lasersystem mit hoher Ausgangsleistung und Stabilität in weiten Teilen neu konstruiert und aufgebaut.

Ultrakurze Laserimpulse wurden in einem modengekoppelten Ti:Saphir-Laseroszillator erzeugt und mit einem regenerativen Verstärker mit Hilfe der CPA-Technik (Chirped Pulse Amplification) auf Impulsenergien von ca. 1 mJ verstärkt. Sie dienten zur Erzeugung der durchstimmbaren Anregungsimpulse, die mit Hilfe eines nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkers (NOPA) generiert wurden, und zur Erzeugung von breitbandigem Abtastlicht zur spektral aufgelösten Detektion transienter Absorptionsänderungen im sichtbaren Wellenlängenbereich. Mit diesem Femtosekundenspektrometer konnten Absorptionsänderungen im Promillebereich verfolgt werden.

Die Aufnahme von Dauerstrich-Fluoreszenzspektren erfolgte in einem leicht modifizierten hochempfindlichen Ramanspektrometer. Dabei konnten die Fluoreszenzquantenausbeuten von BR verifiziert und die Ausbeuten von sSRI und pSRII erstmalig bestimmt werden. Während die Fluoreszenzquantenausbeute von pSRII mit $1,3 \times 10^{-4}$ etwa der von BR entspricht, liegt der Wert von sSRI um ca. eine Größenordnung höher. Aus den Quantenausbeuten und den Absorptions- und Fluoreszenzspektren wurden die Lebensdauer der elektronisch angeregten Zustände der verschiedenen Proben abgeschätzt.

Die Ultrakurzzeitmessungen an BR waren in guter Übereinstimmung mit den bisherigen Literaturdaten. Im Zeitbereich der ersten 200 fs nach der Anregung findet man in der transienten Absorption schnelle nichtexponentielle Veränderungen, die auf eine Blauverschiebung des Spektrums des elektronisch angeregten Zustands und damit auf ein schnelles Herunterlaufen des angeregten Wellenpakets auf der Potentialfläche hindeuten.

Die Primärreaktion von Sensorrhodopsin II wurde anhand von zwei Proben untersucht, einmal bei SRII aus *Halobacterium salinarum* (sSRII) und zum anderen bei SRII aus *Natronobacterium pharaonis* (pSRII). Trotz der unterschiedlichen Herkunft zeigen bei-

de Proteine bis auf kleinere Unterschiede im wesentlichen das gleiche Verhalten. Die Primärreaktion verläuft sehr ähnlich zu BR, die Zerfallszeit des angeregten Zustands liegt bei ca. 400 fs. Vom angeregten Zustand aus wird ein rotverschobener Zustand erreicht, der dem J-Intermediat von BR ähnelt und der innerhalb von etwa 3 ps in einen K-ähnlichen Zustand weiterreagiert. In pSRII findet anschließend noch eine weitere Reaktion statt, die sich an einer sehr geringen, gerade noch messbaren Blauverschiebung des Absorptionsspektrums beobachten lässt. Anhand der durch die Messdatenanpassung gewonnenen Amplituden konnten die Absorptionsquerschnitte der beobachteten Intermediate für die Proben berechnet werden. Die Sensorrhodopsin II-Proben zeigen wie BR ebenfalls deutliche nichtexponentielle Relaxationsprozesse. Die Ergebnisse deuten hier wie bei BR darauf hin, dass die Potentialfläche des angeregten Zustands im Bereich der Franck-Condon-Region steil abfallend ist.

Der Verlauf der Primärreaktion von SRI unterschied sich deutlich von dem der anderen untersuchten Proteine. Die Messungen zeigten nach anfänglichen schnellen Relaxationen innerhalb der ersten 200 fs einen langsamen Zerfall der Population des elektronisch angeregten Zustands, der mit zwei exponentiellen Zeitkonstanten von 5,1 ps und 30 ps angepasst werden konnte. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt, bei dem die Aminosäure Asp76 protoniert ist. Dies legt einen Vergleich mit Halorhodopsin und der BR-Mutante D85T nahe und zeigt den Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung mit dem Gegenion auf die Geschwindigkeit der Primärreaktion.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse können qualitativ in einem Reaktionsmodell verstanden werden, das eine einheitliche Beschreibung der Primärreaktion der Retinalproteine ermöglicht. Entscheidend ist dabei vor allem die Beobachtung, dass mehrere Reaktionskoordinaten berücksichtigt werden müssen. Unmittelbar nach der Lichtanregung erfolgt eine schnelle Relaxation entlang einer bzw. mehrerer Koordinaten, die hochfrequenten C-C- bzw. C-N-Streckschwingungen zugeordnet werden können. Dadurch wird eine barrierelose und schnelle Isomerisierung des Chromophors möglich, falls eine konische Durchschneidung der S_1 - und S_0 -Flächen bei der Bewegung entlang der Torsionskoordinate erreicht werden kann. Die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der verschiedenen Retinalproteine können dabei durch leichte Veränderungen der S_1 -Fläche aufgrund der unterschiedlichen Proteinumgebungen erklärt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Akiyama, A. Yoshimori, T. Kakitani, Y. Imamoto, Y. Shichida, and Y. Hatano. Analysis of the excited state dynamics of 13-*trans*-locked-bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem.*, 101:412–417, 1997.
- [2] T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts, and D. Oesterhelt. The initial reaction dynamics of the light-driven chloride pump halorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 241:559–565, 1995.
- [3] M. T. Asaki, C.-P. Huang, D. Garvey, J. Zhou, H. C. Kapteyn, and M. M. Murnane. Generation of 11-fs pulses from a self-mode-locked ti:sapphire laser. *Opt. Lett.*, 18(12):977–979, 1993.
- [4] G. H. Atkinson, T. L. Brack, D. Blanchard, and G. Rumbles. Picosecond time-resolved resonance raman spectroscopy of the initial trans to cis isomerization in the bacteriorhodopsin photocycle. *Chem. Phys.*, 131:1–15, 1989.
- [5] S. Backus, C. G. Durfee III, M. Murnane, and H. C. Kapteyn. High power ultrafast lasers. *Review of Scientific Instruments*, 69(3):1207–1223, 1998.
- [6] V. Bergo, E. N. Spudich, K. L. Scott, J. L. Spudich, and K. J. Rothschild. FTIR analysis of the SII₅₄₀ intermediate of sensory rhodopsin II: Asp73 is the schiff base proton acceptor. *Biochemistry*, 39:2823–2830, 2000.
- [7] I. B. Berlman, editor. *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules*. Academic Press, 1971.
- [8] D. B. Bivin and W. Stoeckenius. Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. *Journal of General Microbiology*, 132:2167–2177, 1986.
- [9] R. A. Bogomolni and J. L. Spudich. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6250–6254, 1982.
- [10] R. A. Bogomolni and J. L. Spudich. The photochemical reactions of bacterial sensory rhodopsin-I. *Biophys. J.*, 52:1071–1075, 1987.

- [11] A. Brodeur and S. L. Chin. Ultrafast white-light continuum generation and self-focusing in transparent condensed media. *J. Opt. Soc. Am. B*, 16(4):637–650, 1999.
- [12] G. Cerullo, M. Nisoli, and S. De Silvestri. Generation of 11 fs pulses tunable across the visible by optical parametric amplification. *Appl. Phys. Lett.*, 71(25):3616–3618, 1997.
- [13] G. Cerullo, M. Nisoli, S. Stagira, and S. De Silvestri. Sub-8-fs pulses from an ultrabroadband optical parametric amplifier in the visible. *Opt. Lett.*, 23(16):1283–1285, 1998.
- [14] I. Chizhov, G. Schmies, R. Seidel, J. R. Sydor, B. Lüttenberg, and M. Engelhard. The photophobic receptor from *natronobacterium pharaonis*: Temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys. J.*, 75:999–1009, 1998.
- [15] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel. *Nature*, 318:618–624, 1985.
- [16] J. K. Delaney, T. L. Brack, G. H. Atkinson, M. Ottolenghi, G. Steinberg, and M. Sheves. Primary picosecond molecular events in the photoreaction of the BR5.12 artificial bacteriorhodopsin pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:2101–2105, 1995.
- [17] J.-C. Diels and W. Rudolph. *Ultrashort laser pulse phenomena: fundamentals, techniques, and applications on a femtosecond time scale*. Academic Press, 1. edition, 1996.
- [18] J. Dobler, W. Zinth, and W. Kaiser. Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 144:215–220, 1988.
- [19] S. J. Doig, J. R. Philip, and R. A. Mathies. Picosecond time-resolved resonance raman spectroscopy of bacteriorhodopsin’s J, K and KL intermediates. *J. Phys. Chem.*, 95:6372–6379, 1991.
- [20] M. Du and R. Fleming. Femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy of bacteriorhodopsin: direct observation of excited state dynamics in the primary step of the proton pump cycle. *Biophys. Chem.*, 48:101–111, 1993.
- [21] A. Einstein. Zur Quantentheorie der Strahlung. *Physik. Z.*, 18:121–128, 1917.
- [22] M. Engelhard, B. Scharf, and F. Siebert. Protonation changes during the photocycle of sensory rhodopsin II from *natronobacterium pharaonis*. *FEBS Lett.*, 395:195–198, 1996.

- [23] E. Ferrando-May, B. Brustmann, and D. Oesterhelt. A C-terminal truncation results in high level expression of the functional photoreceptor sensory rhodopsin I in the archaeon *halobacterium halobium*. *Mol. Microbiol.*, 9(5):943–953, 1993.
- [24] U. Finkele, K. Dressler, C. Lauterwasser, and W. Zinth. Analysis of transient absorption data from reaction centers of purple bacteria. In M.-E. Michel-Beyerle, editor, *Reaction centers of photosynthetic bacteria*, pages 127–134. Springer-Verlag, 1990.
- [25] G. R. Fleming. *Chemical applications of ultrafast spectroscopy*, chapter 6. Oxford University Press, New York, 1986.
- [26] F. Gai, K. C. Hasson, J. C. McDonald, and P. A. Anfinrud. Chemical dynamics in proteins: The photoisomerisation of retinal in bacteriorhodopsin. *Science*, 279:1886–1891, 1998.
- [27] G. M. Gale, M. Cavallari, T. J. Driscoll, and F. Hache. Sub-20-fs tunable pulses in the visible from an 82-mhz optical parametric oscillator. *Opt. Lett.*, 20(14):1562–1564, 1995.
- [28] M. Garavelli, F. Negro, and M. Olivucci. Initial excited state relaxation of the isolated 11-cis protonated Schiff base of retinal: evidence for in-plane motion from ab initio quantum chemical simulation of the resonance raman spectrum. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:1023–1029, 1999.
- [29] M. Garavelli, T. Vreven, P. Celani, F. Bernardi, M. A. Robb, and M. Olivucci. Photoisomerization path for a realistic retinal chromophore model: the nonate-traeniminium cation. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:1285–1288, 1998.
- [30] D. A. Greenhalgh, D. L. Farrens, S. Subramaniam, and H. G. Khorana. Hydrophobic amino acids in the retinal-binding pocket of bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.*, 268(27):20305–20311, 1993.
- [31] P. Hamm, M. Zurek, T. Röschinger, H. Patzelt, D. Oesterhelt, and W. Zinth. Femtosecond spectroscopy of the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-trans retinal. *Chem. Phys. Lett.*, 263:613–621, 1996.
- [32] G. Haran, K. Wynne, A. Xie, Q. He, M. Chance, and R. M. Hochstrasser. Excited state dynamics of bacteriorhodopsin revealed by transient stimulated emission. *Chem. Phys. Lett.*, 261:389–395, 1996.
- [33] I. Hartl. Das Programm URMEL zur Anpassung zeitaufgelöster Messungen in der Ultrakurzzeitspektroskopie. Praktikumsarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1993.
- [34] I. Hartl. *Sub-Pikosekunden-Spektroskopie der Schwingungsrelaxation von C-H-Streckschwingungen in polyatomaren Molekülen*. Doktorarbeit, Institut für medizinische Optik der Universität München, 1999.

- [35] K. C. Hasson, F. Gai, and P. A. Anfinrud. The photoisomerisation of retinal in bacteriorhodopsin: Experimental evidence for a three state model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:15124–15129, 1996.
- [36] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, and K. H. Downing. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, 213:899–???, 1990.
- [37] J. Hirayama, Y. Imamoto, Y. Shichida, N. Kamo, H. Tomioka, and T. Yoshizawa. Photocycle of phoborhodopsin from haloalkaliphilic bacterium (*natronobacterium pharaonis*) studied by low-temperature spectrophotometry. *Biochemistry*, 31:2093–2098, 1992.
- [38] R. Hoche. Aufbau einer vielkanaldetektion zur messung transienter absorptionsänderungen im femtosekundenbereich und erste anwendungen. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1996.
- [39] I. P. Hohenfeld, A. A. Wegener, and M. Engelhard. Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in escherichia coli. *FEBS Lett.*, 442:198–202, 1999.
- [40] W. Holzapfel. *Aufklärung des ersten Schritts im Elektronentransport bei der Photosynthese von Rhodobacter sphaeroides*. Doktorarbeit, Institut für medizinische Optik der Universität München, 1989.
- [41] W. Holzer, H. Gratz, T. Schmitt, A. Penzkofer, A. Costella, I. Garcia-Moreno, R. Sastre, and F. J. Duarte. Photo-physical characterization of rhodamine 6G in a 2-hydroxyethyl-methacrylate methyl-methacrylate copolymer. *Chem. Phys.*, 256:125–136, 2000.
- [42] R. Huber. Personal communication.
- [43] R. Huber, H. Satzger, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF₂. Submitted to Opt. Comm., 2001.
- [44] W. Humphrey, D. Xu, M. Sheves, and K. Schulten. Molecular dynamics study of the early intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle. *J. Phys. Chem.*, 99:14549–14560, 1995.
- [45] P. Huppmann. *Femtosekundenspektroskopie an photosynthetischen Systemen: Elektronentransfer in Purpurbakterien und Isomerisierung des Retinals in Bacteriorhodopsin*. Doktorarbeit, Institut für medizinische Optik der Universität München, 2000.
- [46] K. Ihara, T. Umemura, I. Katagiri, T. Kitajima-Ihara, Y. Sugiyama, Y. Kimura, and Y. Mukohata. Evolution of the archaeal rhodopsins: evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *J. Mol. Biol.*, 285:163–174, 1999.

- [47] Y. Imamoto, Y. Shichida, J. Hirayama, H. Tomioka, N. Kamo, and T. Yoshizawa. Nanosecond laser photolysis of phoborhodopsin: from natronobacterium pharaonis appearance of KL and L intermediates in the photocycle at room temperature. *Photochem. Photobiol.*, 56:1129–1134, 1992.
- [48] Y. Imamoto, Y. Shichida, T. Yoshizawa, K. Fujikawa, H. Tomioka, T. Takahashi, N. Kamo, and Y. Kobatake. Photoreaction cycle of phoborhodopsin studied by low-temperature spectrophotometry. *Biochemistry*, 30:7416–7424, 1991.
- [49] G. G. Kochendoerfer and R. A. Mathies. Ultrafast spectroscopy of rhodopsins - photochemistry at its best! *Isr. J. Chem.*, 35:211–226, 1995.
- [50] G. G. Kochendoerfer and R. A. Mathies. Spontaneous emission study of the femtosecond isomerization dynamics of rhodopsin. *J. Phys. Chem.*, 100:14526–14532, 1996.
- [51] M. Kolbe, H. Besir, L.-O. Essen, and D. Oesterhelt. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science*, 288:1390–1396, 2000.
- [52] S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakov, J. Ruthman, and N. P. Ernstring. Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing. *Phys. Rev. A*, 59(3):2369–2384, 1999.
- [53] M. P. Krebs, E. N. Spudich, and J. L. Spudich. Rapid high-yield purification and liposome reconstruction of polyhistidine-tagged sensory rhodopsin I. *Prot. Express. Purif.*, 6:780–788, 1995.
- [54] S. L. Lin and B. Yan. Three-dimensional model of sensory rhodopsin I reveals important restraints between the protein and the chromophore. *Protein Engineering*, 10(3):197–206, 1997.
- [55] S. L. Logunov, L. Song, and M. A. El-Sayed. Excited state dynamics of a protonated retinal Schiff base in solution. *J. Phys. Chem.*, 100:18586–18591, 1996.
- [56] A. Losi, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, and J. L. Spudich. Time-resolved absorption and photothermal measurements with sensory rhodopsin I from halobacterium salinarum. *Biophys. J.*, 76:2183–2191, 1999.
- [57] A. Losi, A. A. Wegener, M. Engelhard, W. Gärtner, and S. E. Braslavsky. Time-resolved absorption and photothermal measurements with recombinant sensory rhodopsin II from natronobacterium pharaonis. *Biophys. J.*, 77:3277–3286, 1999.
- [58] H. Luecke, B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailler, and J. K. Lanyi. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 291:899–911, 1999.
- [59] I. Lutz, A. Sieg, A. A. Wegener, M. Engelhard, I. Boche, M. Otsuka, D. Oesterhelt, J. Wachtveitl, and W. Zinth. Primary reactions of sensory rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(3):962–967, 2001.

- [60] O. E. Martinez, J. P. Gordon, and R. L. Fork. Negative group-velocity dispersion using refraction. *J. Opt. Soc. Am. A*, 1(10):1003–1006, 1984.
- [61] W. Marwan and D. Oesterhelt. Signal formation in the halobacterial photophobic response mediated by a fourth retinal protein (P₄₈₀). *J. Mol. Biol.*, 195:333–342, 1987.
- [62] W. Marwan and D. Oesterhelt. Biochemische Mechanismen einer einfachen Verhaltensreaktion. *Chemie in unserer Zeit*, 33(3):140–151, 1999.
- [63] Richard A. Mathies, C. H. Cruz, Walter T. Pollard, and Charles V. Shank. Direct observation of the femtosecond excited-state cis-trans isomerisation in bacteriorhodopsin. *Science*, 240:777–779, 1988.
- [64] E. Mayr. Two empires or three? *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95:9720–9723, 1998.
- [65] G. Metz, F. Siebert, and M. Engelhard. Asp85 is the only internal aspartatic acid that gets protonated in the m intermediate and the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin. a solid state ¹³C CP-MAS NMR investigation. *FEBS Lett.*, 303:237–241, 1992.
- [66] M. Nonella. Electrostatic protein-chromophore interactions promote the *all-trans*→*13-cis* isomerization of the protonated retinal Schiff base in bacteriorhodopsin: an ab initio CASSCF/MRCI study. *J. Phys. Chem. B*, 104:11379–11388, 2000.
- [67] M. C. Nuss, W. Zinth, and W. Kaiser. Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 117:1–7, 1985.
- [68] Dieter Oesterhelt. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Current Opinion in Structural Biology*, 8:489–500, 1998.
- [69] J. Olmsted. Calorimetric determinations of absolute fluorescence quantum yields. *J. Phys. Chem.*, 83(20):2581–2584, 1979.
- [70] N. Patenge, A. Haase, H. Bolhuis, and D. Oesterhelt. The gene for a halophilic β -galactosidase (bgaH) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *halobacterium halobium*. *Mol. Microbiol.*, 36(1):105–113, 2000.
- [71] J. W. Petrich, J. Breton, J. L. Martin, and A. Antonetti. Femtosecond absorption spectroscopy of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.*, 137:369–375, 1987.
- [72] H. J. Polland. *Die ersten Schritte der Photosynthese in den retinalhaltigen Proteinen Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin*. Doktorarbeit, Institut für medizinische Optik der Universität München, 1984.

- [73] H.-J. Pollard, M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt. Early picosecond events in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 49:651–662, 1986.
- [74] W. T. Pollard, S.-Y. Lee, and R. A. Mathies. Wave packet theory of dynamic absorption spectra in femtosecond pump-probe experiments. *J. Chem. Phys.*, 92(7):4012–4029, 1989.
- [75] P. Rath, E. Spudich, D. D. Neal, J. L. Spudich, and K. J. Rothschild. Asp76 is the schiff base counterion and proton acceptor in the proton-translocating form of sensory rhodopsin I. *Biochemistry*, 35:6690–6696, 1996.
- [76] M. K. Reed, M. K. Steiner-Shepard, M. S. Armas, and D. K. Negus. Microjoule-energy ultrafast optical parametric amplifiers. *J. Opt. Soc. Am. B*, 12(11):2229–2236, 1995.
- [77] G. Renger. Photosynthese. In W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, and H. Ziegler, editors, *Biophysik*. Springer-Verlag, 1978.
- [78] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Spoerlein, and W. Zinth. Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the nir. *Appl. Phys. B*, 71:457–465, 2000.
- [79] S. Sartania, Z. Cheng, M. Lenzer, G. Tempea, Ch. Spielmann, and F. Krausz. Generation of 0.1-TW 5-fs optical pulses at a 1-khz repetition rate. *Opt. Lett.*, 22(20):1562–1564, 1997.
- [80] J. Sasaki and J. L. Spudich. Proton circulation during the photocycle of sensory rhodopsin II. *Biophys. J.*, 77:2145–2152, 1999.
- [81] J. Sasaki and J. L. Spudich. Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer-binding. *Biochim. Biophys. Acta*, 1460:230–239, 2000.
- [82] B. Scharf, B. Pevec, B. Hess, and M. Engelhard. Biochemical and photochemical properties of the photophobic receptors from *halobacterium halobium* and *natronobacterium pharaonis*. *Eur. J. Biochem*, 206:359–366, 1992.
- [83] B. Scharf and E. K. Wolff. Phototactic behaviour of the archaebacterial *natronobacterium pharaonis*. *FEBS Letters*, 340:114–116, 1994.
- [84] B. Schrader and W. Meier, editors. *Raman/IR atlas of organic compounds*, volume 2. Verlag Chemie, 1978.
- [85] M. Seel, E. Wildermuth, and W. Zinth. A multichannel detection system for application in ultra-fast spectroscopy. *Meas. Sci. Technol.*, 8:449–452, 1997.
- [86] A. V. Sharkov, A. V. Pakulev, S. V. Chekalin, and Y. A. Matveets. Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 808:94–102, 1985.

- [87] K. Shimono, M. Iwamoto, M. Sumi, and N. Kamo. Effects of three characteristic amino acid residues of pharaonis phoborhodopsin on the absorption maximum. *Photochem. Photobiol.*, 72:141–145, 2000.
- [88] A. Sieg. Femtosekundenspektroskopie an retinalhaltigen chromoproteinen. Diplomarbeit, Institut für medizinische Optik der Universität München, 1999.
- [89] E. N. Spudich, W. Zhang, M. Alam, and J. L. Spudich. Constitutive signaling by phototaxis receptor sensory rhodopsin II from disruption of its protonated schiff base-aspartate-73 interhelical salt bridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4960–4965, 1997.
- [90] J. L. Spudich and R. A. Bogomolni. Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, 312:509–513, 1984.
- [91] J. L. Spudich and R. A. Bogomolni. Sensory rhodopsins of halobacteria. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17:193–215, 1988.
- [92] G. Steinmeyer, D. H. Sutter, L. Gallmann, N. Matuschek, and U. Keller. Frontiers in ultrashort pulse generation: pushing the limits in linear and nonlinear optics. *Science*, 286:1507–1512, 1999.
- [93] S. J. Strickler and R. A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.*, 37(4):814–822, 1962.
- [94] D. H. Sutter, G. Steinmeier, L. Gallmann, M. Matuschek, F. Morier-Genoud, U. Keller, V. Scheuer, G. Angelow, and T. Tschudi. Semiconductor saturable-absorber mirror-assisted Kerr-lens mode-locked Ti:sapphire laser producing pulses in the two-cycle regime. *Opt. Lett.*, 24(9):631–633, 1999.
- [95] T. Takahashi, H. Tomioka, N. Kamo, and Y. Kobatake. A photosystem other than ps370 also mediates the negative phototaxis of *halobacterium halobium*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 28:161–164, 1985.
- [96] T. Takahashi, B. Yan, P. Mazur, F. Derguini, K. Nakanishi, and J. L. Spudich. Color regulation in the archaeobacterial phototaxis receptor phoborhodopsin (sensory rhodopsin II). *Biochemistry*, 29:8467–8474, 1990.
- [97] J. Tittor and D. Oesterhelt. The quantum yield of bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.*, 263:269–273, 1990.
- [98] H. Tomioka, T. Takahashi, N. Kamo, and Y. Kobatake. Flash spectrometric identification of a fourth rhodopsin-like pigment in *halobacterium halobium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139:389–395, 1986.
- [99] E. B. Treacy. Optical pulse compression with diffraction gratings. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, QE-5(9):454–458, 1969.

- [100] Q. Wang, R. Schoenlein, L. Peteanu, R. Mathies, and C. Shank. ??? *Science*, 266:422–???, 1994.
- [101] A. Warshel, Z. T. Chu, and J.-K. Hwang. The dynamics of the primary event in rhodopsins revisited. *Chem. Phys.*, 158:303–314, 1991.
- [102] T. Wilhelm. *Spektroskopie auf der 10 fs-Zeitskala: Abstimmbare, sichtbare Lichtimpulse durch nichtkollineare parametrische Verstärkung und Untersuchung der S_1 -Dynamik von Azulen*. Doktorarbeit, Institut für medizinische Optik der Universität München, 1998.
- [103] T. Wilhelm, J. Piel, and E. Riedle. Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter. *Opt. Lett.*, 22(19):1494–1496, 1997.
- [104] E. K. Wolff, R. A. Bogomolni, P. Scherrer, B. Hess, and W. Stoeckenius. Color discrimination in halobacteria: Spectroscopic characterization of a second sensory receptor covering the blue-green region of the spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7272–7276, 1986.
- [105] K. Wynne, G. Haran, G. D. Reid, C. C. Moser, P. L. Dutton, and R. M. Hochstrasser. Femtosecond infrared spectroscopy of low-lying excited states in reaction centers of *rhodobacter sphaeroides*. *J. Phys. Chem.*, 100:5140–5148, 1996.
- [106] K. Wynne, G. D. Reid, and R. M. Hochstrasser. Regenerative amplification of 30-fs pulses in ti:sapphire at 5 khz. *Opt. Lett.*, 19(12):895–897, 1994.
- [107] L. Xu, Ch. Spielmann, and F. Krausz. Ultrabroadband ring oscillator for sub-10-fs pulse generation. *Opt. Lett.*, 21(16):1259–1261, 1996.
- [108] B. Yan, K. Nakanishi, and J. L. Spudich. Mechanism of activation of sensory rhodopsin I: Evidence for a steric trigger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9412–9416, 1991.
- [109] B. Yan and J. L. Spudich. Evidence that the repellent receptor form of sensory rhodopsin I is an attractant signaling state. *Photochem. Photobiol.*, 54(6):11023–1026, 1991.
- [110] B. Yan, T. Takahashi, R. Johnson, and J. L. Spudich. Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of stimulus-induced confirmations: the case of sensory rhodopsin II. *Biochemistry*, 30:10686–10692, 1991.
- [111] B. Yan, A. Xie, G. U. Nienhaus, Y. Katsuta, and J. L. Spudich. Steric constraints in the retinal binding pocket of sensory rhodopsin I. *Biochemistry*, 32:10224–10232, 1993.
- [112] A. Yariv. *Optical Electronics*. John Wiley & Sons, 4. edition, 1991.

- [113] T. Ye, N. Friedman, Y. Gat, G. H. Atkinson, M. Sheves, M. Ottolenghi, and S. Ruhman. On the nature of the primary light-induced events in bacteriorhodopsin: Ultrafast spectroscopy of native and C₁₃=C₁₄ locked pigments. *J. Phys. Chem. B*, 103:5122–5130, 1999.
- [114] J. Zhou, C.-P. Huang, C. Shi, M. M. Murnane, and H. C. Kapteyn. Generation of 21-fs millijoule-energy pulses by use of ti:sapphire. *Opt. Lett.*, 19(2):126–128, 1994.
- [115] W. Zinth, A. Sieg, P. Huppmann, T. Blankenhorn, D. Oesterhelt, and M. Nonella. Femtosecond spectroscopy and model calculations for an understanding of the primary reaction in bacteriorhodopsin. In T. Elsaesser, S. Mukamel, M.M. Murnane, and N.F. Scherer, editors, *Ultrafast Phenomena XII*, Springer Series in Chem. Physics 66, pages 677–679. 2000.

Besonders danken möchte ich:

Prof. Wolfgang Zinth für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am IMO bzw. BMO durchführen zu können und dabei jede Menge lernen zu können.

Prof. Josef Wachtveitl für Gartenfeste, Diskussionen, Volleyballspiele, Kindersitze, gute Betreuung und vieles mehr.

Sebastian Spörlein für langjährige hervorragende Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen aus Z20 als da wären Robert Huber, Arne Sieg, Helmut Satzger und viele andere, für ein sehr gutes Arbeitsklima.

Benno Fonrobert für sein stetes Bemühen um den Humanismus und die Kultivierung des schlechten Witzes.

Irene Boche, die die SRI-Proben hergestellt und mich mit vielen nützlichen Tips und Literatur versorgt hat.

Masato Otsuka, der die sSRII-Proben hergestellt hat.

Prof. Martin Engelhard für die pSRII-Proben.

Den Werkstattmitarbeitern, Rudi Schwarz, Alfons Storck und Christian Hausmann für ihre Freundlichkeit, gute Zusammenarbeit und die schnelle Erledigung zahlreicher mechanischer Arbeiten.

Lebenslauf

Name: Ingo Lutz
Geburtsdatum: 6.1.1969
Geburtsort: München
Familienstand: ledig, ein Kind

Schulausbildung:

1975-1979: Grundschule in München
1979-1988: Ludwigs-Gymnasium in München
1988: Abitur
1988-1990: Zivildienst

Studium:

1990-1997: Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1996-1997: Diplomarbeit am Institut für Medizinische Optik der LMU
1997: Diplom
1997-2000: Promotionsstudium Physik an der LMU
seit 1997: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für medizinische Optik
bzw. Institut für BioMolekulare Optik