

Teilprojekt B 3: **Ultrakurzzeitdynamik von Photoreaktionen in nativer und synthetischer Proteinumgebung**

Teilprojektleiter: **Prof. Dr. D. Stehlik**

Dienstanschrift: **Freie Universität Berlin, Institut für Experimentalphysik,
Arnimallee 14, 14195 Berlin**

Kommunikation: Tel: 0049 30 838 55069 FAX: 0049 30 838 56081
E-Mail: stehlik@physik.fu-berlin.de
Internet: <http://www.physik.fu-berlin.de/~ag-stehlik/shomepage.html>

Teilprojektleiter: **Dr. R. Diller**

Dienstanschrift: **Freie Universität Berlin, Institut für Experimentalphysik,
Arnimallee 14, 14195 Berlin**

Kommunikation: Tel: 0049 30 838 56107 FAX: 0049 30 838 56081
E-Mail: diller@physik.fu-berlin.de
Internet: <http://www.physik.fu-berlin.de/~diller/>

Fachgebiet: **Ultrakurzzeitspektroskopie, Biologische Photosysteme**

Keywords: **Femtosecond pump-probe-spectroscopy, photoinduced processes in chromoproteins, reaction dynamics, vibrational (IR) and optical spectroscopy.**

Summary of results obtained during the first period, July 1998-2000

Our studies on ultrafast dynamics of protein-based photoreactions concentrated on three subjects: (A) protein-induced reaction control in Bacteriorhodopsin with emphasis on charges in the cofactor binding pocket, (B) construction of a pulsed IR-spectrometer for ultrafast IR-vibrational spectroscopy and first test-experiments on bacteriorhodopsin reconstituted with a locked retinal and (C) the first characterisation of photoinduced ultrafast reactions of a bacterial phytochrome by optical transient spectroscopy including the observation of coherent vibrational dynamics.

To this end the palette of apparatus and methods was broadened substantially: 1. Thanks to the DFG grants to Teilprojekt A3 and B3, another, new generation laser system

could be implemented and is shared with TP A3. It comprises a Ti-Sa CPA - laser which can pump several NOPAS's (noncollinear optical parametric amplifier) Thus, independently tunable lightsources ($\tau_p < 40$ fs at 1 kHz, 470 – 750 nm, $E_p > 1$ μ J) for "pump-probe" - experiments at high time resolution are available. 2. For probing the excitation pulse induced dynamics of vibrational degrees of freedom a pulsed ($\tau_p = 200$ fs), mid-IR laser source was built including multichannel detection (B).

Due to organizational reasons it was not possible to carry out the studies on synthetic protein-systems (planned in UP II) in parallel to the intensively performed projects (A), (B) and (C). The IR-excitation experiments (UP II) are within the bounds of possibility but require the coordination with the planned Teilprojekt B6 (Hamm).

Übersicht über Ergebnisse aus der ersten Förderperiode, Juli 1998-2000

Unsere Arbeiten an der Ultrakurzzeitdynamik Protein-gestützter Photoreaktionen konzentrierte sich auf drei Schwerpunkte: (A) Umgebungsinduzierte Reaktions-Steuerung in Bakteriorhodopsin mit Hauptaugenmerk auf die Ladungen in der Kofaktor-Bindungstasche, (B) Aufbau des gepulsten IR-Spektrometers zur Beschreibung der Ultrakurzzeitdynamik durch IR-Schwingungsspektroskopie, sowie erste optische Testmessungen an Bakteriorhodopsin, welches mit einem geblockten Retinal rekonstituiert wurde und (C) Die erstmalige Beschreibung der Ultrakurzzeitdynamik photoinduzierter Reaktionen eines bakteriellen Phytochroms durch optische Spektroskopie bis hin zur Beobachtung kohärenter Schwingungsdynamik.

Dazu wurde eine substantielle Erweiterung der Palette der Apparaturen und Methoden durchgeführt: 1. Zusammen mit Teilprojekt A3 (Schwentner/Dietrich) konnte dank der von der DFG an TP A3 und B3 bewilligten Investitionsmittel ein weiteres, gemeinsam genutztes Kurzzeitlasersystem neuerer Generation implementiert werden. Es besteht aus einem Ti-Sa CPA – Laser, mit dem mehrere NOPA's (nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker) betrieben werden können. Damit stehen unabhängig durchstimmbare Kurzpuls – Laserquellen ($\tau_p < 40$ fs bei 1 kHz, 470 – 750 nm, $E_p > 1$ μ J) für „pump-probe“ – Experimente bei hoher Zeitauflösung zur Verfügung. 2. Zur Untersuchung der Anregungspuls-induzierten Dynamik von Schwingungsfreiheitsgraden wurde eine gepulste Abtast-Laserquelle ($\tau_p = 200$ fs) im mittleren Infrarot-Bereich samt breitbandiger Vielkanaldetektion aufgebaut, wie in Abschnitt B näher beschrieben.

Die Arbeiten mit synthetischen Proteinsystemen (UP II) konnten aus organisatorischen Gründen parallel zu den intensiv vorangetriebenen Projekten (A), (B) und (C) nicht wie geplant durchgeführt werden. Die ebenfalls in UP II vorgesehenen IR-Anregungsexperimente sind zwar durch die in (B) getätigten Aufbauarbeiten in den Bereich des Möglichen gerückt, bedürfen aber der Abstimmung mit dem geplanten neuen Teilprojekt B6 (Hamm).

A. TRANS-CIS - ISOMERISIERUNG IN BAKTERIORHODOPSIN: MODIFIZIERTE UMGEBUNG, PROZESS-STEUERUNG

In Bakteriorhodopsin (bR) ist der Retinal-Chromophor über eine positiv geladene Schiff'sche Base kovalent mit dem Lysin-Rest K216 verbunden. Durch die Wechselwirkung zwischen dieser Ladung und den geladenen bzw. polarisierbaren Gruppen in der Chromophor - Bindungstasche kommt es zu einer umgebungsinduzierten Kontrolle der all-trans zu 13-cis Photoisomerisierung des Chromophors. Im allgemeinen wird beim Austausch von geladenen Aminosäureresten in der Chromophor - Bindungstasche gegen ungeladene eine drastische Verlangsamung sowie biphasisches Verhalten des Zerfalls des elektronisch angeregten Zustandes beobachtet /1, 2, 3/. Viele Indizien weisen darauf hin, daß der unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Asp85 eine kritische Rolle für die auf 0.5 ps beschleunigte Isomerisierung des Retinal-Chromophors in bR zukommt. In der ersten Förderperiode wurden im Zuge der Dissertation von Herrn K. Heyne /Hey01/ an einer Reihe von bR-Mutanten (R82A, R82C, R82Q, G231C, R82A/G231C) und anderweitig modifizierten bR-Systemen Femtosekunden-zeitaufgelöste Absorptionsexperimente durchgeführt /HDD98, HHD00/. Die wichtigsten Ergebnisse werden hier zusammengefaßt.

Reaktionskontrolle: In Abb. A.1 ist die Steuerung der Photoisomerisierung bei physiologischem pH durch Kinetiken von Wildtyp bR (wt bR), den Einfachmutanten R82A und G231C sowie der Doppelmutante R82A/G231C demonstriert. Die Abtastwellenlängen umfassen dabei den Bereich der Absorption des elektronisch angeregten Zustandes (480 nm), der Grundzustands- und Produktabsorption (640 u. 700 nm) sowie der stimulierten Emission (900 nm). Deutlich zeigt sich das wt-gleiche Verhalten von G231C, die Verlangsamung der Reaktion in R82A, sowie die völlige Revertanz der Doppelmutante bezüglich der schnellen (0.5 ps) Photoisomerisierung im Wildtyp. Dies ist offenbar die Konsequenz einer (langreichweitigen!) Induktion /4/, die durch eine sterische Störung (hier Austausch von

Glycin gegen Cystein in Position 231 im cytoplasmatischen (!) Bereich von Helix G), eine Änderung des Protonierungszustandes von geladenen Gruppen in der Chromophor - Bindungstasche und von dort relevanten Wasserstoffbrücken hervorruft. Diese Störung führt offenbar zu einer Deprotonierung von D85. Auf ähnliche, langreichweitige Interaktionen weisen röntgenstrukturelle Ergebnisse hin, insbesondere der Vergleich zwischen der bR-Struktur und der M-Struktur.

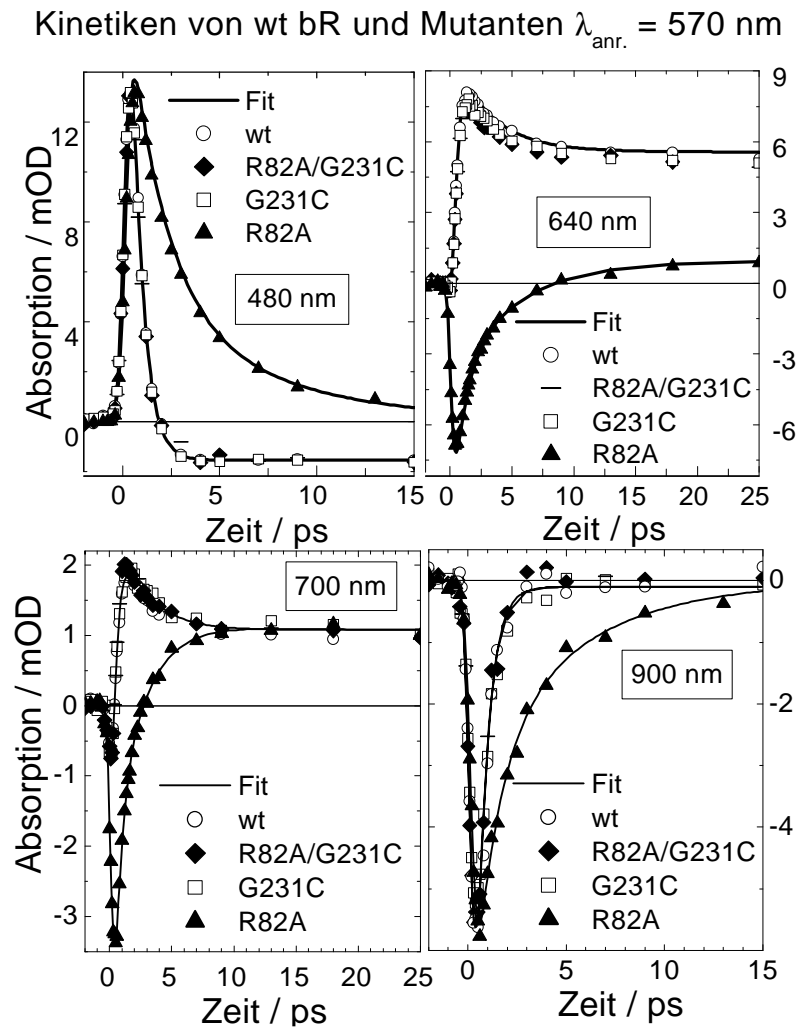


Abb. A.1: Ausgewählte Kinetiken und Fits von bR wt und Mutanten G231C, R82A/G231C und R82A. Anregung bei 580 nm; neutraler pH; 15 mM KCl; Zimmertemperatur. Die Kinetiken von wt (Kreise), G231C (Quadrat) und R82A/G231C (Rauten) stimmen sehr gut miteinander überein. Die Kinetik der R82A Mutante zeigt einen langsameren Zerfall bei 480 und 900 nm und weicht auch bei den anderen Abtastwellenlängen von den übrigen Kinetiken ab. Die Parameter der Fits sind in den Tabellen A.1 und A.2 aufgeführt.

Die Revertanz der Doppelmutante zeigt damit, daß bei physiologischem pH die positive Ladung der R82 nicht notwendig ist, um D85 deprotoniert zu halten und so die schnelle

Isomerisierung mit 0.5 ps wie im wt zu ermöglichen. Hinweise darauf, daß auch die negative Ladung von D212 keine direkter Bestandteil des "diffusen" Gegenions zur positiv geladenen Schiff'schen Base ist, werden verfolgt. Diese Ergebnisse sind wichtig für die Charakterisierung derjenigen Parameter bzw. Aminosäurenreste, welche für die Reaktionssteuerung kritisch sind. Sie haben damit große Bedeutung, zum einen für den Vergleich mit den Isomerisierungsreaktionen in anderen photoaktiven Retinalproteinen, zum anderen können sie Datenmaterial für theoretische Modellrechnungen zur Isomerisierung liefern.

Probe	pH	λ_{\max}/nm	τ_1/ps	τ_2/ps	A1	A2
wt	7.0	568	0.55(5)	–	1.0	–
wt	10.0	568	0.53(5)	–	1.0	–
R82A/G213C	7.0	567	0.57(5)	–	1.0	–
R82A/G213C	10.0	567	0.54(5)	–	1.0	–
G231C	7.0	568	0.57(5)	–	1.0	–
R82C	10.0	565	0.48(5)	4.9(1.0)	0.83(2)	0.17(2)
R82Q	10.0	560	0.43(5)	2.5(6)	0.85(2)	0.15(3)
R82A	10.0	562	0.51(5)	–	1.0	–

Tab. A.1: Purpurne bR Formen (I_{\max} ca. 570 nm in der lichtadaptierten Form). Aufgeführt sind pH der Proben und die Zerfallszeiten τ_i mit Amplituden A_i im Bereich der Absorption des angeregten Zustandes bei 480 nm. Die Fits wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen und Faltung mit der Systemresponse durchgeführt. Anregung bei 580 nm. Salzkonzentration: 15 mM KCl.

Probe	pH	λ_{\max}/nm	τ_1/ps	τ_2/ps	A1	A2
R82A	7.0	≈ 600	1.7(2)	6.4(8)	0.66(5)	0.34(5)
R82A	5.8	≈ 600	1.7(3)	6.4(1.2)	0.64(9)	0.36(10)
R82C	7.0	585	1.8(2)	12.4(9)	0.57(3)	0.43(3)
R82C	5.8	≈ 590	1.5(2)	8.4(9)	0.59(5)	0.41(5)
R82C–Hg ⁺	5.8	585	1.4(2)	8.3(8)	0.59(4)	0.41(4)
wt	2.7	603	1.8(5)	12(3)	0.51(4)	0.49(4)
R82A/G231C	2.7	602	[2.5(6)]	[21.8(7.3)]	0.66(11)	0.34(9)
wt–deion.	≈ 5	602	1.9(3)	11.8(7)	0.53(2)	0.47(2)
wt–deion. Ca(2+)	≈ 5	602	1.7(3)	13.6(1.6)	0.54(4)	0.46(5)
R82A/G231C– deion.	≈ 5	602	1.8(2)	12.4(8)	0.49(1)	0.51(1)

Tab. A.2: Blaue bR Formen (I_{\max} ca. 570 nm). Aufgeführt sind pH der Proben und Grundzustands-Absorptionsmaximum und die Fitresultate d.h. Zerfallszeiten τ_i mit Amplituden A_i im Bereich der Absorption des angeregten Zustandes bei 480 nm. Anregung bei 580 nm. Salzkonzentration: 15 mM KCl (mit Ausnahme der deionisierten Proben). Bei wt BM Ca 2+ wurden der deionisierten Probe äquimolar Kalziumionen zugeführt.

Dynamik: Durch breit angelegte Untersuchungen wurde das Datenmaterial für die Korrelation zwischen dem Protonierungszustand von D85 und dem Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes /3/ wesentlich erweitert (Tab. A.1,2). In bR-Formen mit negativ geladener D85 (purpurne Form) findet sich im wesentlichen ein monoexponentieller Zerfall von 0.52 ps (s. Tab. A.1), während in bR-Formen mit protonierter D85 (blaue Formen) ein biexponentieller Zerfall mit Zeiten bei 1.7 und 6 - 12 ps vorliegt (s. Tab. A.2). In Abb. A.2 sind als Beispiele Kinetiken von wt bR und R82A mit jeweils deprotonierter (geladener) und protonierter D85 dargestellt.

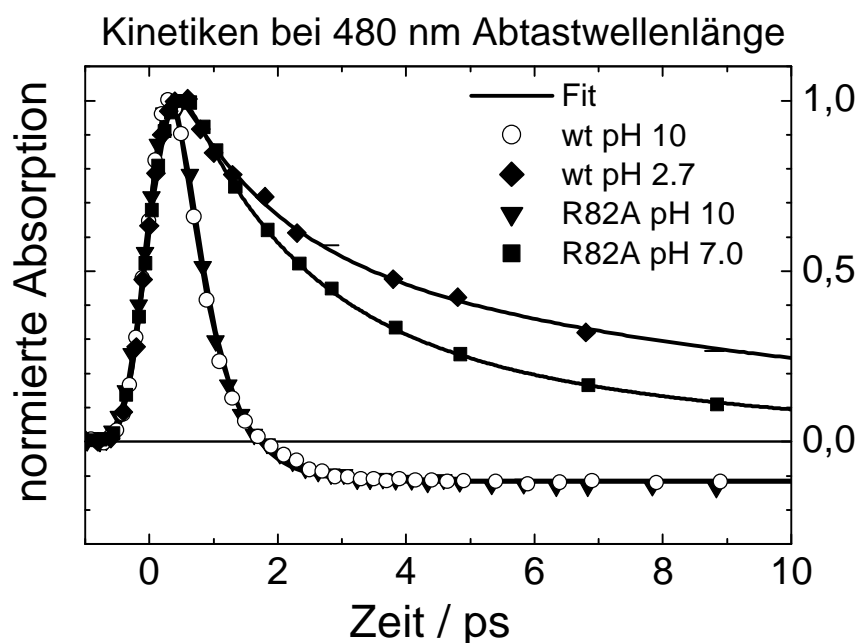


Abb. A.2: Kinetiken von bR-Formen mit deprotonierter D85: wt pH 10.0 (Kreise), R82A pH 10.0 (Dreiecke) sowie von bR-Formen mit protonierter D85: wt pH 2.7 (Rauten), R82A pH 7.0 (Quadrate) und Fits mit den Parametern aus Tabellen A.1 und A.2. Anregung bei 580 nm. Abtastwellenlänge: 480 nm.

Der Gesamtvergleich der in den Tabellen A.1 und A.2 aufgeführten Zeitkonstanten liefert eine Verteilung der Zerfallszeiten $\tau_1 = 0.52 \pm 0.05$ ps (purpurne Form) und $\tau_1 = 1.7 \pm 0.3$ ps (blaue Form), die relativ schmal ist, wohingegen τ_2 der blauen Form, selbst innerhalb R82 Mutanten, eine starke Variation von etwa 6 bis 12 ps aufweist. Die Stabilität der Zeitkonstanten τ_1 bei Variation der chemischen Spezifikationen der Probe durch Mutation, pH oder Ionenkonzentration unterstützt die Hypothese, daß hauptsächlich der Protonierungszustand der D85 den Wert der Zeitkonstante τ_1 vorgibt. Da τ_2 im Gegensatz zu τ_1 eine breite Spanne von Werten bei Veränderung der molekularen Parameter aufweist, liegt

der Schluß nahe, daß hier andere Protein-Chromophor-Wechselwirkungen den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes bestimmen.

Zwei weitere interessante Einzelergebnisse sollen hier kurz Erwähnung finden. Das erste betrifft die Rolle der räumlichen Feinpositionierung der positiven Ladung am Aminosäurerest 82, wie sie im Zeitverhalten von wt und R82C-Hg(+) deutlich wird. Zweitens konnte durch Anregung des Retinalchromophors im N-Intermediat die Zerfallszeit seines elektronisch angeregten Zustandes zu 1.9 ± 0.2 ps bestimmt werden. Da der Retinalchromophor im N-Intermediat in einer 13-cis Konfiguration mit protonierter Schiff'schen Base und protonierter D85 vorliegt und die Zerfallszeit erstaunlich gut mit τ_1 aus den blauen Formen übereinstimmt, kann dies einen Hinweis für eine Zuordnung von τ_1 in den blauen Formen zu einer 13-cis Konfiguration des Retinalchromophors im bR-Ausgangszustand liefern.

B. UNTERSUCHUNG DER ULTRAKURZZEITDYNAMIK DURCH IR-SCHWINGUNGSSPEKTROSKOPIE

Ein weiterer wichtiger Zugang zur Untersuchung ultraschneller Reaktionen in Proteinen besteht in der transienten IR-Schwingungsspektroskopie. Durch sie läßt sich die Dynamik aller IR-aktiven Schwingungsmoden des Chromophor-Protein-Komplexes nach Photoanregung abtasten. Wichtig ist der Bereich 800 - 2000 1/cm, in dem wichtige Schwingungsmoden des Chromophors ((C=C)-, (C-C)-, (C=NH)-Streckschwingungen, C-H-"out-of-plane"-Biegeschwingungen, etc.) aber auch C-OH-Streckschwingungen von Aminosäurenresten liegen, sowie der Bereich um 3000 1/cm (X-H-Streckschwingungen). Damit können Fragen angegangen werden, deren Beantwortung durch VIS Spektroskopie nur schwer oder gar nicht möglich ist.

In der Arbeitsgruppe wurden bereits sub-Pikosekunden zeitaufgelöste Messungen an Bakteriorhodopsin durchgeführt, bei denen die Zeitauflösung durch "optisches gaten" eines Dauerstrich-CO-Lasers nach kurzer optischer Anregung erreicht wurde /5, Dil98, Dzi98/. Der damit abdeckbare Spektralbereich ist jedoch vergleichsweise schmal. Es wurde deshalb ein IR - Spektrometer samt breitbandiger Detektion aufgebaut, das auf spektral durchstimmbaren (zentraler Bereich 12 - 5 μm) IR-Pulsen mit ca. 200 fs Dauer, Pulsenergie von ca. 1 μJ und Repetitionsrate von 1 kHz basiert. Bei diesem technisch anspruchsvollem Projekt galt es, Erfahrung mit den optisch parametrischen Aspekten als auch mit elektronischen Aspekten (rauscharme Vorverstärkung) zu sammeln. Auch war es nötig, praktikable Lösungen dafür zu finden, die Apparatur möglichst nahe an das sie "pumpende", intensiv ausgelastete (Teilprojekt A3) Titan-Saphir - Lasersystem zu bringen.

Parallel wurden die Vorbereitungen für die geplanten Experimente an Bakteriorhodopsin mit rekonstituiertem, all-trans - "geblockten" Chromophor erfolgreich abgeschlossen: Die biochemische Retinal-Rekonstituierung von bR zu bR5.12 wurde bei sehr guter Ausbeute in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Heyn/Wallat (FU Berlin, FB Physik) und M. Sheves (Weizmann Institut) in der Arbeitsgruppe etabliert und erste optisch transiente Testmessungen an bR mit all-trans-geblocktem Chromophor (bR5.12) konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Abb. B.1 dokumentiert die transiente Absorption von bR5.12 und die von wt bR ist zum Vergleich dargestellt. Die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes von bR5.12 wurde zu 16(1) ps bestimmt, was dem Literaturwert entspricht.

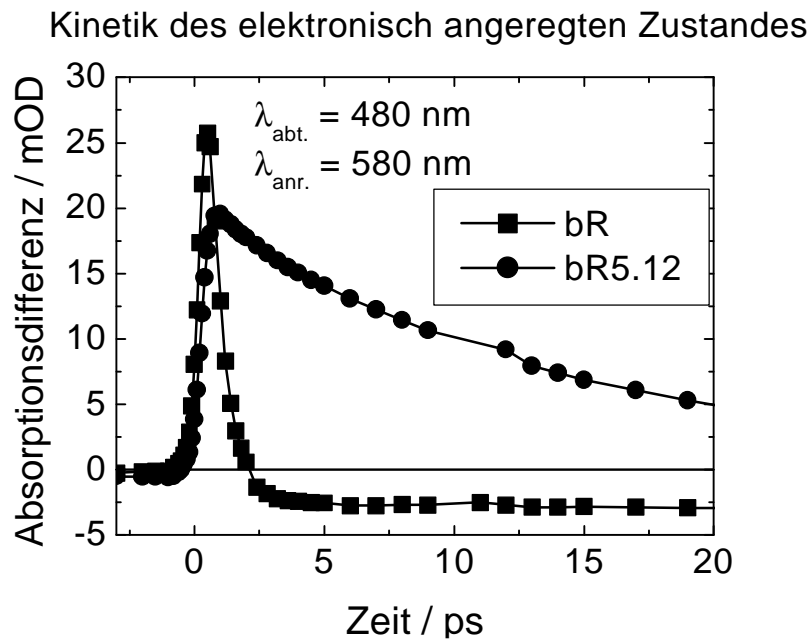


Abb. B.1: Transiente Absorption im Bereich der Absorption des elektronisch angeregten Zustandes von Wildtyp Bacteriorhodopsin (bR) und dem mit "geblocktem" Retinal rekonstituierten Bacteriorhodopsin (bR5.12).

C. ISOMERISIERUNG IN BAKTERIELLEM PHYTOCHROM, DYNAMIK

Phytochrom aus Cyanobakterium *Synechocystis*: Dieses Projekt wurde erst in der zweiten Hälfte der laufenden Förderperiode begonnen und hat die Breite der in der Arbeitsgruppe untersuchten photoaktiven Proteine erheblich erweitert. Da erst vor kurzem veröffentlichungsreife Ergebnisse erzielt wurden, erfolgt die Berichterstattung hierzu ausführlicher. Vor wenigen Jahren /6/ wurde in Cyanobakterium *Synechocystis* erstmals ein bakterielles Phytochrom gefunden (Cph1: Apoprotein; Cph1-X: Cph1 mit Kofaktor X). Cph1 ist in *E.coli* exprimierbar und hat die Forschung an Phytochrom - einem der wichtigsten pflanzlichen Photorezeptoren - stark stimuliert. Unter den vielen Aspekten der Signaltransduktion stellt sich nicht zuletzt die Frage nach dem Vergleich zwischen den photoinduzierten Primärreaktionen in diesen beiden Klassen von Phytochromen, den pflanzlichen und den bakteriellen. In der Literatur finden sich zwar Beschreibungen der Primärreaktion der pflanzlichen Systeme /7, 8, 9/ als einer im ps-Zeitbereich ablaufenden Z-E-Isomerisierung /10/, ein bakterielles System wurde in Hinblick auf seine Primärreaktion

aber noch nicht untersucht. Ein wichtiger Unterschied in der Herangehensweise an diese Fragestellung im Vergleich zu anderen funktionell wichtigen Chromoproteinen ist durch das Fehlen der dreidimensionalen Struktur des Phytochroms begründet. Diese liegt z. B. in Systemen der Photosynthese, Bakteriorhodopsin oder Hämproteinen mit atomarer Auflösung vor. Dadurch ist im Fall von Phytochrom viel weniger über die Protein-Bindungstasche des Chromophors, und damit auch über die Protein-Chromophor - Wechselwirkung bekannt. Der Schwerpunkt für uns lag deshalb auf der Charakterisierung der Dynamik der photoinduzierten Primärreaktionen in Cph1-X.

In enger Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Lamparter (FU Berlin) und Hughes (J. L. Univ. Giessen) wurden deshalb Messungen an der Pr - und der Pfr - Form (vgl. Abb. C.1, C.2) von Cph1-PCB (Cph1 mit dem nativen Chromophor Phycocyanobilin) sowie an Cph1-PEB (Cph1 mit dem Chromophor Phycoerythrobilin) durchgeführt /HHS01/. Vergleichende Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hermann (Jena), am PCB in Lösung (PCB/Meth) und Haferphytochrom vorgenommen. Im folgenden werden die Ergebnisse an Cph1-PCB und Cph1-PEB zusammengefasst.

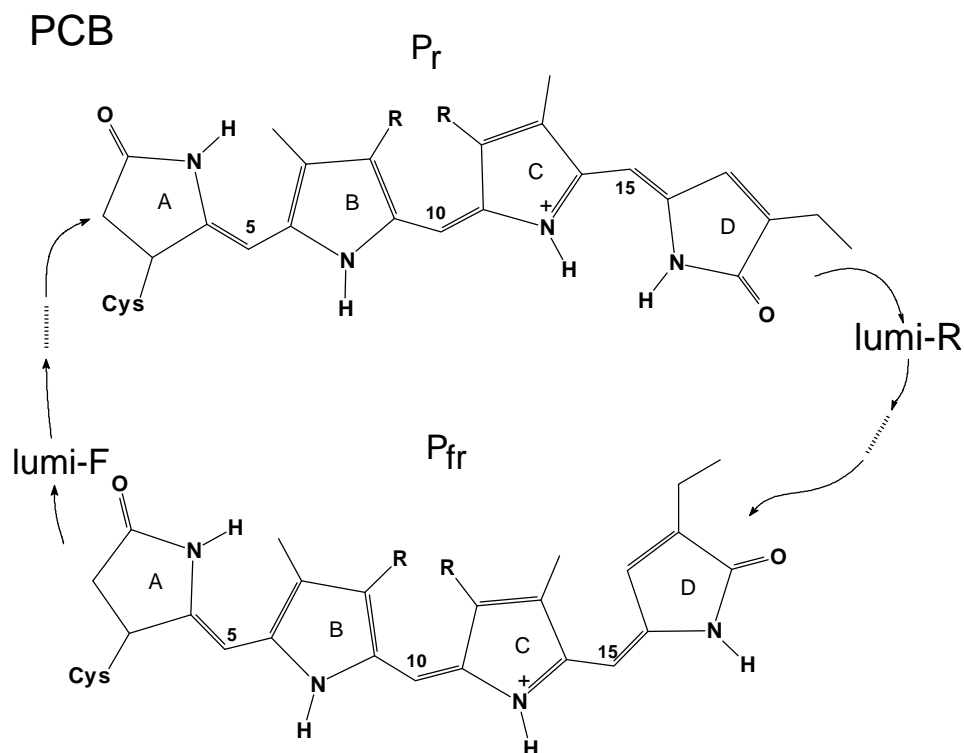


Abb. C.1: Skizze der offenkettigen Tetrapyrrol-Chromophore von Haferphytochrom und eventuell Cph1-PCB nach /11/. Durch Absorption von rotem (red) Licht in der Pr Form und dunkelrotem (far red) Licht in der Pfr Form isomerisiert der Chromophor um die C15=C16 - Doppelbindung und gelangt über mehrere Intermediate zur Pfr bzw. Pr Form. Die jeweiligen Dunkelreaktionen sind im Bereich < 1s abgeschlossen.

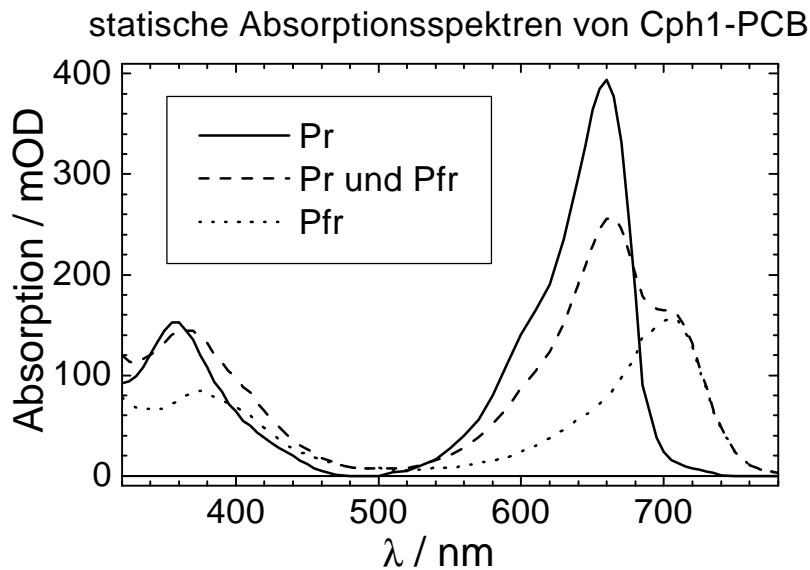


Abb. C.2: Statische Absorptionsspektren von Cph1-PCB in der Pr Form und als Gemisch von Pr und Pfr Form. Das reine Pfr Spektrum wurde aus beiden errechnet. Jeweilige Absorptionsmaxima liegen bei 660 nm (Pr) und 704 nm (Pfr).

C.1: Primärreaktion in Cph1-PCB Pr

Die transiente Absorption wurde in einem breiten Spektralbereich (425-900 nm) nach Anregung bei 650 nm aufgenommen. Dazu wurden unterschiedlich spezifizierte Pump/Probe-Apparaturen benutzt: ein NOPA/Weisslicht (gepulstes spektrales Kontinuum) - Aufbau mit bequemer Durchstimbarkeit aber Systemantwort (Kreuzkorrelation) von 120 fs FWHM und ein NOPA/NOPA - Aufbau mit höherer Zeitauflösung (Systemantwort von 45 fs FWHM). Bei der globalen Analyse aller verfügbaren Messdaten wurde zwischen dem Langzeitbereich (>1ps) und dem Kurzzeitbereich (<1ps) unterschieden.

Langzeitbereich: Eine Auswahl von transienten Differenzspektren nach Anregung bei 650 nm ist in Abb. C.3 gezeigt. Die Daten wurden global analysiert. Dazu wurden verschiedene Fitmodelle zugrundegelegt und getestet. Es stellte sich heraus, daß zwei Modelle die Dynamik im Langzeitbereich recht gut beschreiben. Modell (I) besteht aus einer Summe von N=2 Exponentialfunktionen:

$$\Delta A = A_0(I) + \sum_1^N A_i(I) * e^{-t_i/I} \quad (I),$$

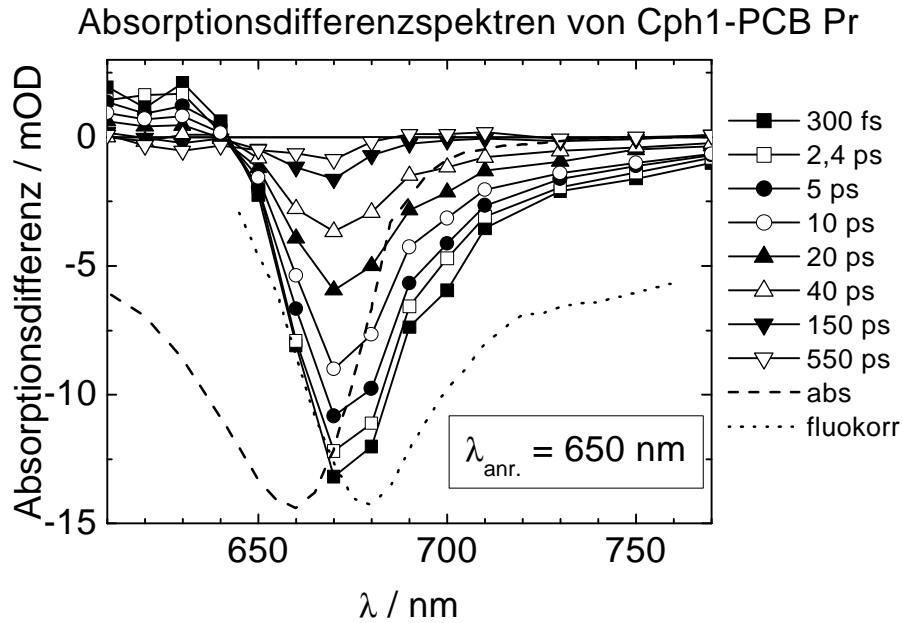


Abb. C.3: Absorptionsdifferenzspektren von Cph1-PCB Pr bei verschiedenen Verzögerungszeiten. Dargestellt ist auch der Verlauf der Grundzustandsabsorption (abs) und der Wellenlängen-korrigierten Fluoreszenz (fluokorr).

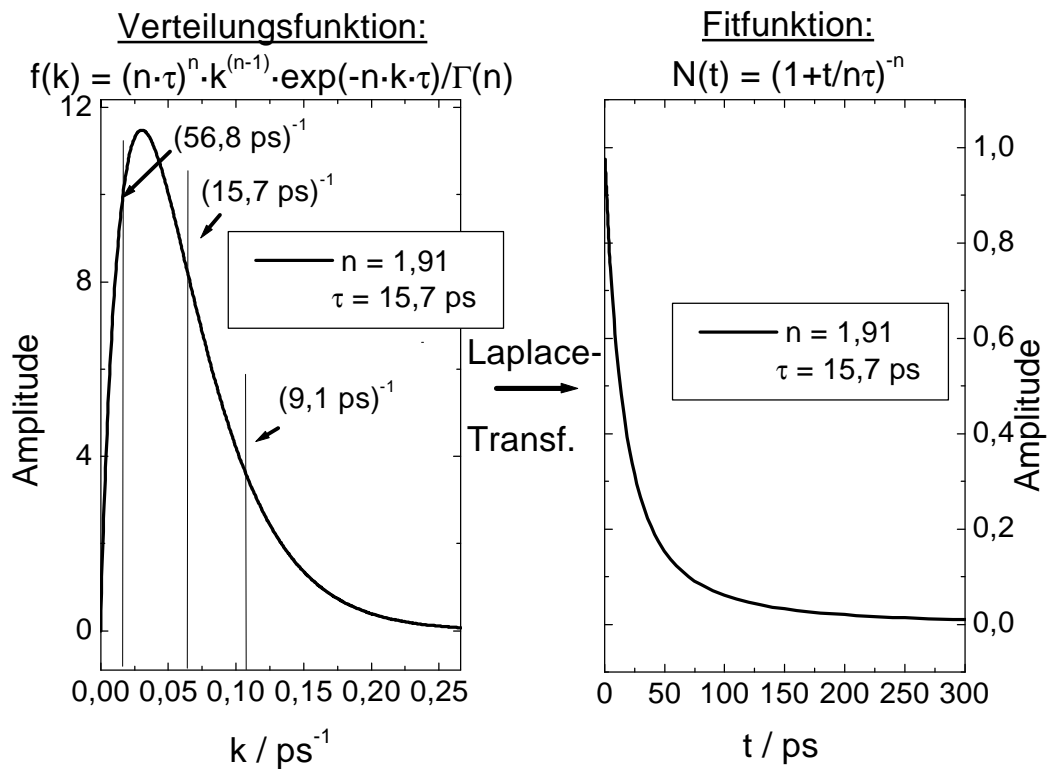


Abb. C.4: Verteilungsfunktion $f(k)$ von Ratenkonstanten k (links) sowie ihre Laplace-Transformierte $N(t)$ (rechts), die als Fitfunktion benutzt wurde. Dargestellt ist das Ergebnis für Cph1-PCB Pr (unter Berücksichtigung aller Messergebnisse) mit $n=1,9$, $t=15,7$ ps. Die Standardabweichung von t wird beschrieben durch die Grenzen $k=1/9,1$ ps und $1/56,8$ ps.

mit apparenten Zerfallszeiten τ_i und Amplituden A_i . Modell (II) nimmt eine Verteilung von Ratenkonstanten

$$f(k) = \frac{(nt)^n k^{n-1}}{\Gamma(n)} e^{-ntk} \quad (\text{II})$$

an, die durch die Rate $k_0 = 1/\tau$ im Schwerpunkt und ihre Standardabweichung $\sim k_0/\sqrt{n}$ bestimmt wird. Ihre Laplace-Transformierte

$$\Delta A = A_0(I) + A_1(I) \left(1 + \frac{t}{nt}\right)^{-n} \quad (\text{II}')$$

wurde als Fitfunktion verwendet (Abb. C.4).

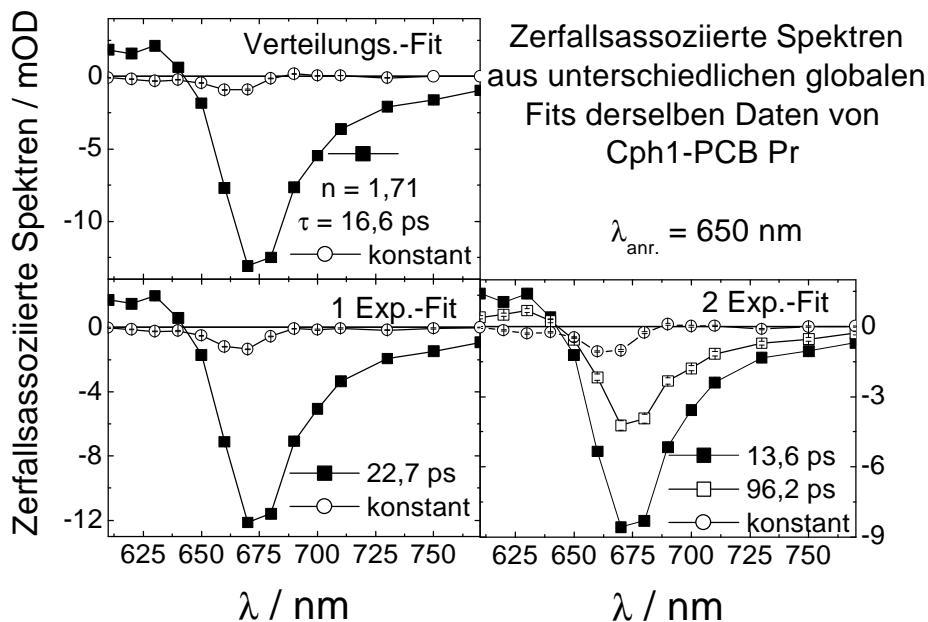


Abb. C.5: Zerfallsassozierte Spektren (ZAS) aus verschiedenen Fitfunktionen von Cph1-PCB Pr. Anregung bei 650 nm.

In Abb. C.5 sind die zerfallsassozierten Spektren (ZAS) $A_i(\lambda)$ für den Langzeitbereich unter Zugrundelegung einer monoexponentiellen Fitfunktion, einer biexponentiellen Fitfunktion (Modell I) sowie der Verteilungsfunktion (Modell II) dargestellt. Augenfalliges Merkmal ist, daß im wesentlichen nur zwei unterschiedliche Spektren erscheinen: Das zeitlich konstante ZAS ($A_0(\lambda)$), welches das Differenzspektrum zu langen Zeiten widerspiegelt, sowie ein ZAS, das die Dynamik beschreibt. Auch im biexponentiellen Modell können keine spektralen

Unterschiede in den beiden ZAS festgestellt werden, die mit den zwei Lebensdauern verknüpft sind. Eine genaue Analyse der Residuen der Fits der kinetischen Kurven sowie ihres jeweiligen χ^2 zeigt 1.: Die monoexponentielle Fitfunktion zeigt eine schlechtere Übereinstimmung zwischen ihrem zeitlich konstanten ZAS und dem Differenzspektrum bei großen Zeiten im Bereich der Photoprodukt-Absorption, und die Residuen der Fits der kinetischen Kurven zeigen klare, systematische Abweichungen gegenüber den experimentellen Daten. 2.: Ein triexponentieller Fit (größere Zahl der Fitparameter!) zeigt klare Mängel in der Eindeutigkeit. Damit scheidet mono- und triexponentielle Beschreibung aus. 3.: Die biexponentielle Funktion und die Verteilungs-Funktion beschreiben die Daten etwa gleich gut, obwohl letztere einen Fitparameter weniger hat als erstere. Da zudem die beiden ZAS des biexponentiellen Fits $A_1(\lambda)$ und $A_2(\lambda)$ gleich sind, wird dem Verteilungsmodell der Vorrang gegeben.

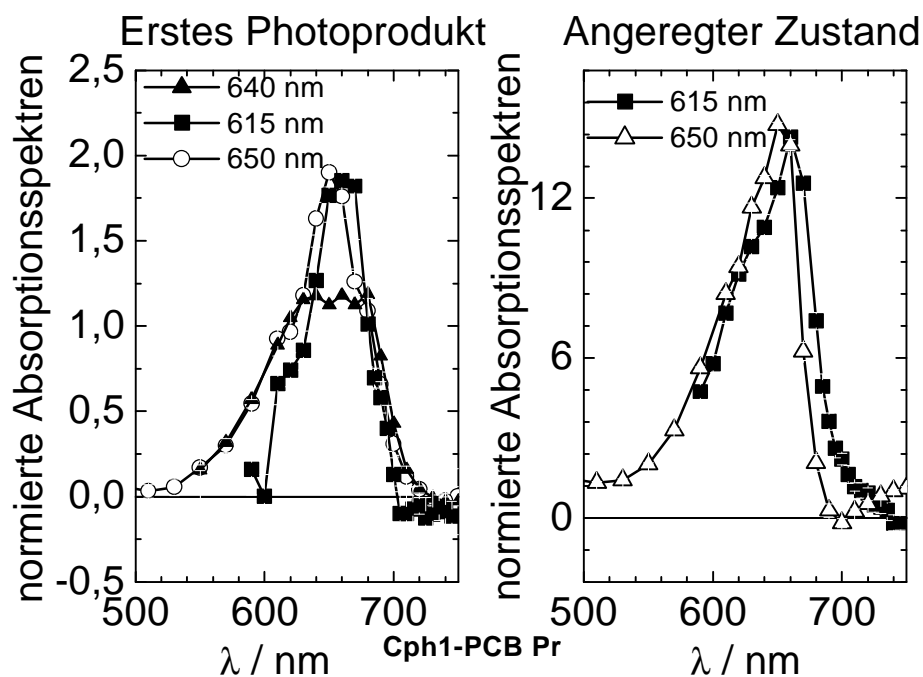


Abb. C.6: Links: Berechnetes Spektrum des ersten Photoproduktes. Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen wie angegeben. Spektrum nach Anregung bei 640 nm aus sub-ns-Messungen [13]. Rechts: Berechnetes Spektrum des elektronisch angeregten Zustands. Anregung bei unterschiedlichen Wellenlängen wie angegeben.

Die Verteilungsfunktion beschreibt damit gleichermaßen den Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes und der stimulierten Emission sowie die Wiederbesetzung des

Grundzustandes Pr und die Entstehung des Produktes im elektronischen Grundzustand. Der Schwerpunkt der Ratenverteilung liegt bei $k = 1/15.7$ ps, ihre Breite ist durch $n = 1.9$ gegeben. Aus den zeitabhängigen Differenzspektren (Abb. C.3) lassen sich unter Zuhilfenahme des stationären Grundzustandsabsorptionsspektrums von Cph1-PCB Pr sowie des Wellenlängenkorrigierten Fluoreszenzspektrums [12] näherungsweise die Spektren des elektronisch angeregten Zustandes und des ersten Photoproduktes berechnen (Abb. C.6). Es zeigt sich, daß beide einen großen Überlapp mit dem Spektrum des Pr-Grundzustandes aufweisen. Zusätzlich zeigt das Spektrum des elektronisch angeregten Zustandes einen substantiellen Ausläufer im kurzwelligen Bereich.

Cph1-PCB Pr Kinetiken im fs-Zeitbereich ; $\lambda_{\text{anr.}} = 650$ nm

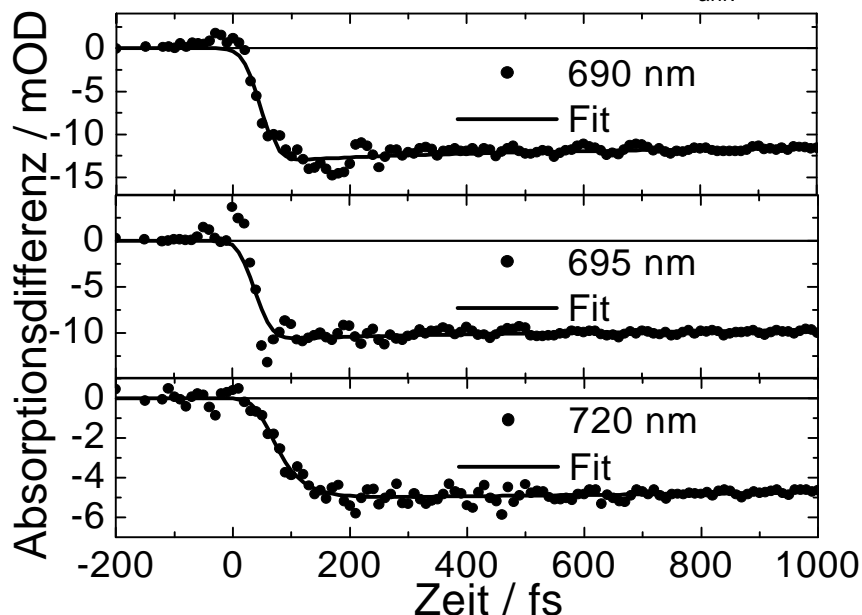


Abb. C.7: Auswahl von Kinetiken im fs-Zeitbereich. Die Systemantwort betrug etwa 44 fs. Die durchgezogenen Linien stellen Fits der Daten dar (Exponentialfunktionen mit Faltung der Systemantwort).

Kurzzeitbereich: In diesem Bereich (< 1 ps) setzt sich das beobachtete Signal aus verschiedenen Beiträgen zusammen. Zum einen handelt es sich dabei um "artifizielle" Beiträge, die aus der nichtlinearen Wechselwirkung der kurzen Laserpulse mit dem Küvettenmaterial und dem Lösungsmittel resultieren. Diese konnten weitgehend quantitativ erfaßt und vom Meßsignal abgezogen werden. Zum anderen finden hier schnelle Relaxationsprozesse statt, die das System aus den durch die Anregung erreichten Franck-Condon-Zuständen herausführen. Die schnelle Anregung (Systemantwort 44 fs) mit einem

spektral breiten Puls kann auch zur Bildung von Wellenpaketen im Grundzustand oder im elektronisch angeregten Zustand führen und wird ansatzweise auch in diesem System beobachtet (s.u.). In Abb. C.7 sind drei kinetische Kurven gezeigt. Die globale Analyse aller Daten ergab im wesentlichen, daß die Dynamik in diesem Zeitbereich durch zwei Zeitkonstanten (40-100 fs und 150 ± 50 fs) bestimmt wird. Sie zeigen sich im An- bzw. Abklingen der stimulierten Emission, doch ihre genauere Zuordnung zu molekularen Prozessen bedarf noch weiterer Untersuchungen.

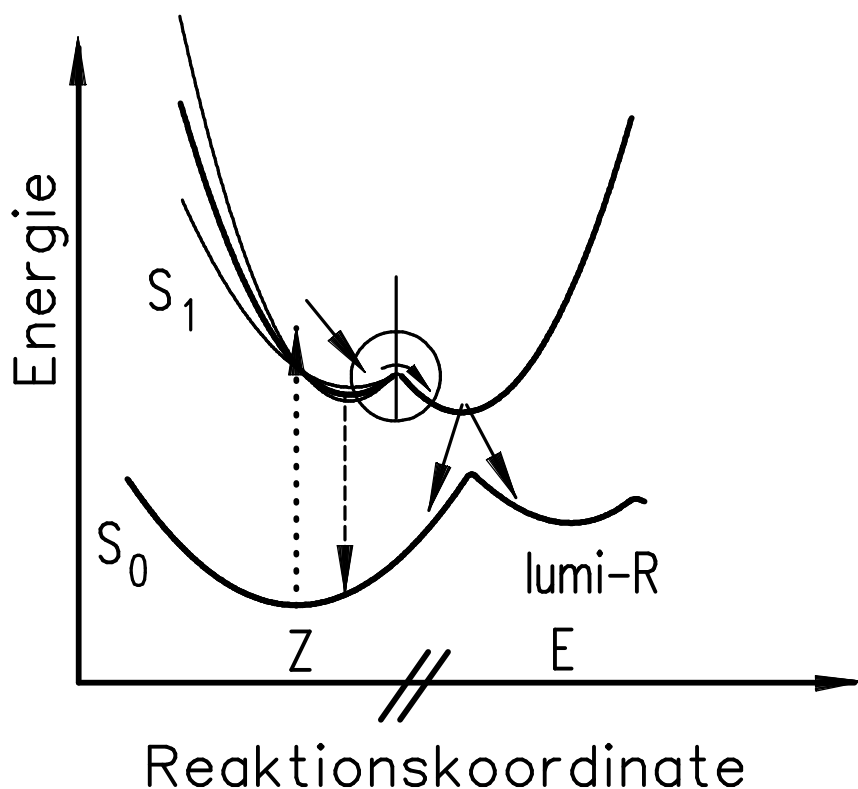


Abb. C.8: Schematische Darstellung des Potentialschemas der Primärreaktion von Cph1-PCB Pr. Anregung: , Fluoreszenz: -----.

Auf der Basis der Daten im Kurz- und Langzeitbereich wird folgendes **Modell für die Primärreaktion in Cph1-PCB Pr** vorgeschlagen (vgl. Abb. C.8): Die nach Anregung des offenkettigen Tetrapyrrol-Chromophors besetzten Franck-Condon-Zustände werden durch schnelle Relaxationsschritte im Zeitbereich 100 fs verlassen und ein lokales Minimum wird besetzt. Die energetische Verteilung der S1-Energiehyperfläche in diesem Bereich ist in Abb. C.8 durch dünnere Linien angedeutet. Durch thermische Aktivierung wird daraufhin im ps-Zeitbereich eine Potentialbarriere überwunden. Die Dynamik dieses Schrittes wird dabei durch eine Verteilung von Raten mit Schwerpunkt bei $1/15.7$ ps beschrieben (Abb. C.8). Der

senkrechte Balken und der Kreis sollen andeuten, daß es sich hier um einen Sattelpunkt handelt, der den ratenlimitierenden Schritt bewirkt. Die Existenz der Potentialbarriere ist in Einklang mit temperaturabhängigen Fluoreszenzstudien /12/. Nach der Überwindung der Potentialbarriere folgt eine Verzweigungsreaktion in den Produkt-Grundzustand bzw. zurück in den Pr-Grundzustand. Anregung in der Schulter der Cph1-PCB Pr - Absorptionsbande (Abb. C.2) bei 615 nm ergab ein sehr ähnliches Bild der Dynamik mit kleinen, aber signifikanten Unterschieden in den Parametern der Raten-Verteilungsfunktion. Der Vergleich mit ns-s-zeitaufgelösten Absorptions- und Resonanz-Raman - Experimenten sowohl an Haferphytochrom /11/ als auch an Cph1-PCB Pr /10/ legt nahe, daß ausgehend von der Z-Konfiguration bzgl. der C15=C16 - Doppelbindung mit der Produktbildung im ps-Zeitbereich der lumi-R - Zustand in E-Konfiguration erreicht wird.

Vergleich mit der Primärreaktion von Haferphytochrom: Der ps-Zeitbereich der Primärreaktion von Haferphytochrom Pr wird in der Literatur kontrovers dargestellt: Mathies und Mitarbeiter /7/ gehen davon aus, daß eine einzige Ratenkonstante die Primärreaktion treffend beschreibt. Hermann und Mitarbeiter /8/ sehen Anzeichen für zwei Ratenkonstanten unter Beteiligung unterschiedlicher, elektronisch angeregter Zustände, während Holzwarth und Mitarbeiter /9/ die Primärreaktion mit einer Verteilung von Ratenkonstanten beschreiben. Die kritische Diskussion unserer Meßdaten unter Einbeziehung aller in der Literatur veröffentlichten Daten legt den Schluß nahe, daß bei Zimmertemperatur das hier für cyanobakterielles Phytochrom erarbeitete, kinetische Modell auch für Haferphytochrom Pr zutreffend ist, womit unter den bisher angebotenen Alternativen entschieden werden kann. Die Primärreaktionen in Haferphytochrom und in Cph1-PCB Pr wären danach sehr ähnlich (bis auf spektrale Unterschiede in den jeweils sich entsprechenden intermediären Spezies). Dieser Schluß wird zusätzlich dadurch unterstützt, daß die bei der Primärreaktion der Pfr Form in Cph1-PCB beobachteten Zerfallszeiten von 600 fs und 3.2 ps (s.u.) gut mit den Zerfallszeiten in Haferphytochrom Pfr übereinstimmen /8, 9, 14, 15/.

C.2.: Primärreaktion in Cph1-PCB Pfr

Nach der photoinduzierten Pr - Pfr - Reaktion wird der Reaktionszyklus durch die photoinduzierte Pfr - Pr - Reaktion geschlossen. In Abb. C.9 sind Kinetiken von Cph1-PCB Pfr nach Anregung bei 727 nm dargestellt. Hier liegt weniger Datenmaterial vor, doch läßt sich die Primärreaktion klar durch zwei Zeitkonstanten von ca. 600 fs und ca. 3 ps beschreiben. Es liegt nahe, hier eine barriereloses Potential im angeregten Zustand anzunehmen, im auffälligen Gegensatz zum Potentialverlauf der Pr - Pfr Photoreaktion. Für Haferphytochrom Pfr liegen ähnliche Ergebnisse vor (s.o.).

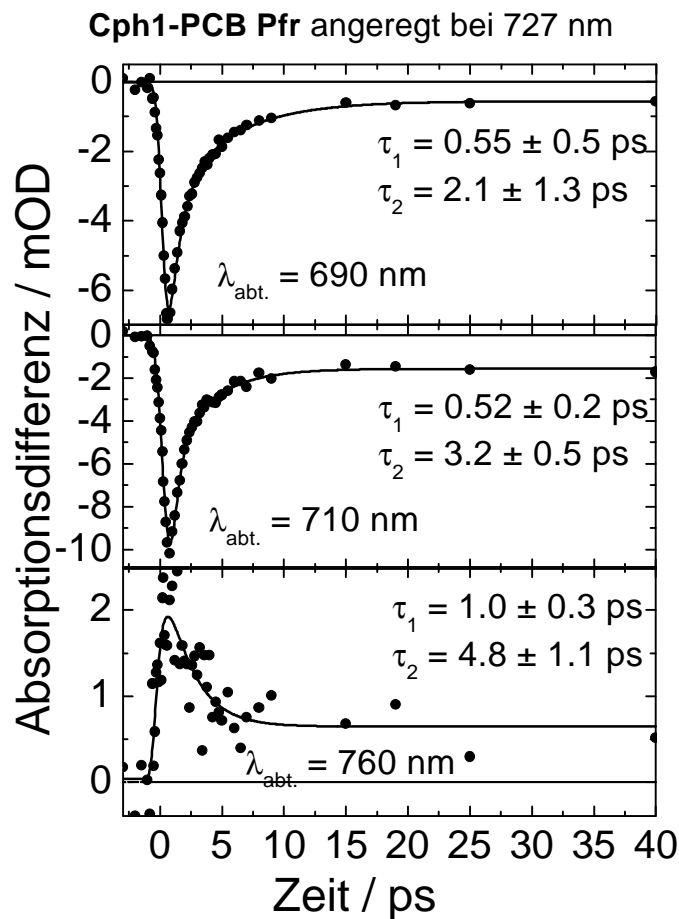


Abb. C.9: Kinetiken von Cph1-PCB Pfr bei unterschiedlichen Abtastwellenlängen, sowie Anpassung durch biexponentielle Fitfunktion. Anregung bei 727 nm.

C.3.: Primärreaktion in Cph1-PEB

Als erster Vergleich mit einem rekonstituierten System wurde die Primärreaktion von Cph1-PEB untersucht. Hier ist der Chromophor Phycocyanobilin (PCB) gegen Phycoerythrobilin (PEB) ausgetauscht. Dieser zeichnet sich durch eine C15-C14 - Einfachbindung aus. Da deshalb im Protein keine Photoisomerisierung stattfindet, kann an diesem System in Zukunft untersucht werden, welche Relaxationsprozesse im Chromophor und/oder im Protein allein durch die fast "instantane" optische Anregung induziert werden. Erste Ergebnisse zeigen im Kurzzeitbereich ein Anwachsen der stimulierten Emission mit ca. 35 fs und einen weiteren schnellen Prozess von ca. 150 fs. Der Langzeitbereich ist charakterisiert durch den Zerfall der stimulierten Emission mit ca. 1.1 ns (0.7 - 2 ns). Diese Zeit deckt sich mit den Zerfallszeiten von 0.71, 2.6 und 4.5 ns aus zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen /16/ an Cph1-PEB der Arbeitsgruppe Heyn (FU Berlin, Fachbereich Physik). In Abb. C.10 ist das experimentelle Differenzspektrum von Cph1-PEB nach 60 ps befriedigend genau simuliert durch die gewichtete Summe von Grundzustandsabsorption, ν^3 -korrigierter Fluoreszenz und dem Spektrum des elektronisch angeregten Zustandes.

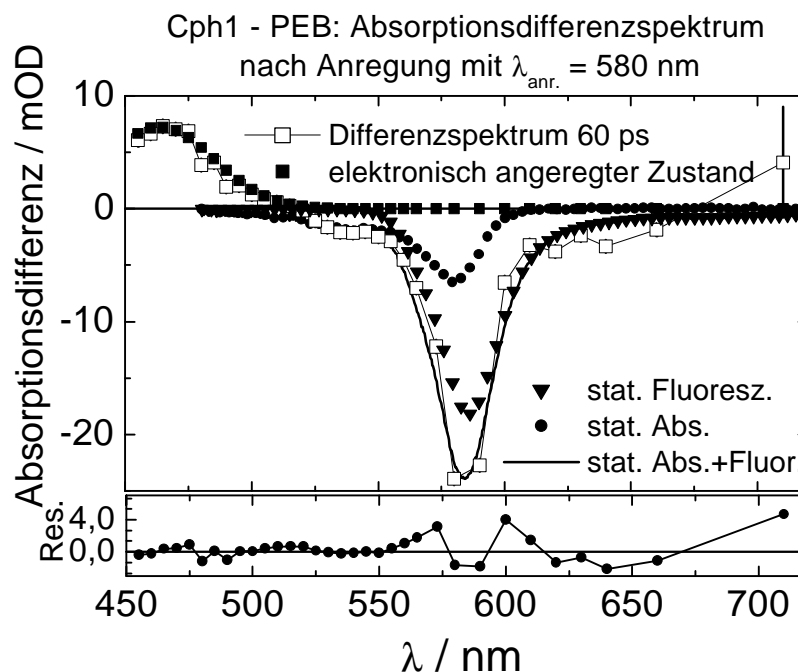


Abb. C.10: Simulation des exp. Differenzspektrums nach 60 ps durch die gewichtete Summe von Grundzustandsabsorption, ν^3 -korrigierter Fluoreszenz und dem Spektrum des elektronisch angeregten Zustandes.

Wellenpaketdynamik

Auch in einem so komplexen molekularen System wie Cph1-X wird die Antwort auf eine ultraschnelle Anregung prinzipiell aus einem kohärenten Anteil und einem dephasierten bzw. dissipativem Anteil bestehen. Wir stellen hier die Beobachtbarkeit kohärenter Dynamik in Cph1-X fest: Im Kurzzeitbereich (< 1 ps) der Messungen an Cph1-PEB und Cph1-PCB Pr finden sich oszillatorische Anteile, die Wellenpaketdynamik anzeigen können. Sie bedürfen einer besseren Charakterisierung, insbesondere um sie dem elektronisch angeregten Zustand oder dem Grundzustand zuzuordnen und ihren Zusammenhang mit der Reaktion einschätzen zu können. In Abb. C.11 ist die Summe der Fourierspektren von Residuen der kinetischen Kurven (vgl. Abb. C.7) im Bereich von 675-720 nm dargestellt. Zum Vergleich sind die Lagen von Resonanz-Raman Banden /17/ von Haferphytochrom-PCB Pr angegeben.

Die Ergebnisse sind Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen, z. B. die Bestimmung niedriger Schwingungsfrequenzen des Chromophors und der Frage nach dem Zusammenhang zwischen den betreffenden Schwingungskordinaten und den reaktiven Koordinaten.

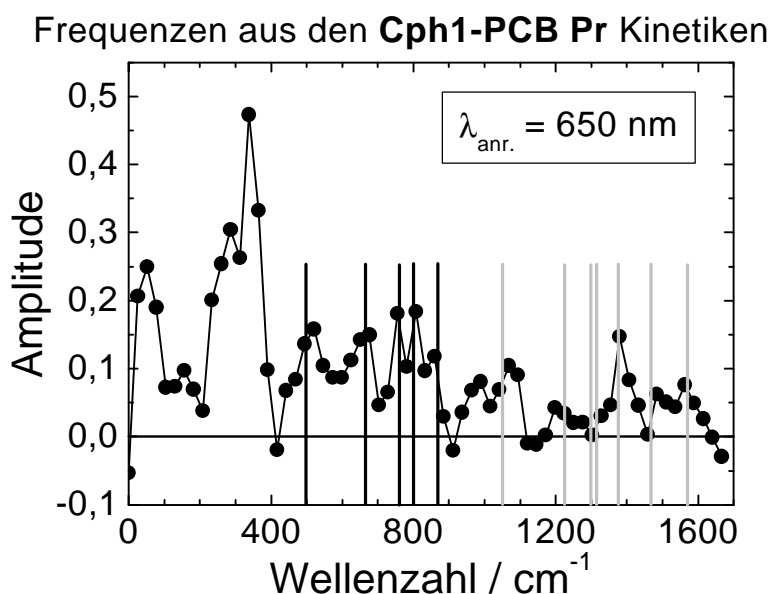


Abb. C.11: Summe der Fourierspektren der Residuen von Kinetiken aus Cph1-PCB Pr. Die Balken bezeichnen die Lage von RR-Banden von Haferphytochrom-PCB Pr. Dick eingezeichnete Balken liegen im Bereich der mit der verfügbaren Zeitaufösung auflösbaren Schwingungsfrequenzen.

Literatur

- /1/ T. Kobayashi, M. Terauchi, T. Kouyama, M. Yoshizawa und M. Taiji, SPIE Laser Applications in Life Sciences 1403 407 (1990)
- /2/ Li Song, M. A. El-Sayed und J. K. Lanyi, Science 261 891 (1993)
- /3/ W. Zinth, A. O. Sieg, P. Huppmann, T. Blankenhorn, M. Nonella und D. Oesterhelt, XII Int. Conf. Ultr. Phen. Technical Digest, WA5-1, (2000)
- /4/ U. Alexiev, R. Mollaaghababa, H.G. Khorana und M.P. Heyn, J. Biol. Chem. 275 13431 (2000)
- /5/ R. Diller, S. Maiti, G. C. Walker, B. R. Cowen, R. S. Pippenger, R. Bogomolni und R. M. Hochstrasser, Chem. Phys. Lett. 241 109 (1995)
- /6/ J. Hughes, T. Lamparter, F. Mittmann, E. Hartmann, W. Gärtner, A. Wilde und T. Börner, Nature 386 663 (1997)
- /7/ F. Andel, K.C. Hasson, F. Gui, P.A. Anfinrud und R.A. Mathies, Biospectroscopy 3 421 (1997)
- /8/ M. Bischoff, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena; Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Jena (2000)
- /9/ A. Holzwarth, M.G. Müller, I. Martin, W. Schlamann, W. Gärtner, S. Braslavsky und K. Schaffner, DFG-Rundgespräch: Spektroskopie an Photorezeptoren (1999)
- /10/ A. Remberg, I. Lindner, T. Lamparter, J. Hughes, C. Kneip, P. Hildebrandt, S.E. Braslavsky, W. Gärtner und K. Schaffner, Biochemistry 36 13389 (1997)
- /11/ F. Andel, J.C. Lagarias und R.A. Mathies, Biochemistry 35 15997 (1996)
- /12/ V. Sineshchekov, J. Hughes, E. Hartmann und T. Lamparter, J. Photochem. Photobiol., 67(2) 263 (1998)
- /13/ B. Borucki et al., Daten aus ns bis s Absorptionsdifferenzmessungen an Cph1-PCB, persönliche Mitteilung (2000)
- /14/ S. Rentsch, M. Bischoff, G. Hermann und D. Strehlow, Appl. Phys. B 66 259 (1998)
- /15/ M. Bischoff, G. Hermann, S. Rentsch und D. Strehlow, J. Phys. Chem. A 102 4399 (1998)
- /16/ H. Otto, B. Borucki und M.P. Heyn, persönliche Mitteilung

/17/ F. Anhel, J.T. Murphy, J.A. Haas, M.T. McDowell, I. van der Hoef, J. Lugtenburg, J.C. Lagarias und R.A. Mathies, *Biochemistry* 39 2667 (2000)

Publikationen

/Dil98/ R. Diller: Vibrational Relaxation during the Retinal Isomerization in Bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.* 295 47 (1998)

/Dzi98/ R. Dziewior: Subpikosekunden-Infrarotspektroskopie der *trans-cis*-Isomerisierung in Bacteriorhodopsin. Dissertation, Freie Universität Berlin (1998)

/HDD98/ K. Heyne, R. Dziewior, R. Diller und U. Alexiev: Single and Double Mutants of Bacteriorhodopsin and their Impact on Photoisomerization. *Ultrafast Phenomena XI*, Eds.: T. Elsaesser, J.G. Fujimoto, D.A. Wiersma and W. Zinth, Springer Verlag, Seite 681 (1998)

/DRD99/ R. Dziewior, K. Romey und R. Diller: Femtosecond time resolved infrared spectroscopy of the ethylenic stretch vibration during the all-trans to 13-cis isomerization of bacteriorhodopsin. *Laser Chem.* 19 173 (1999)

/Byr99/ M. Byrdin: Messungen und Modellierungen zur Dynamik angeregter Zustände in Photosystem I. Dissertation, Freie Universität Berlin, (1999)

/Rim99/ I. Rimke: Energie- und Ladungstransferkinetik in Photosystem II Kernkomplexen. Dissertation, Freie Universität Berlin (1999)

/HHD00/ K. Heyne, J. Herbst, B. Dominguez-Herradon, U. Alexiev und R. Diller: Reaction Control in Bacteriorhodopsin: Impact of Arg82 and Asp85 on the Fast Retinal Isomerization, Studied in Arg82Ala/Gly231Cys and Various Purple and Blue Forms of Bacteriorhodopsin. *Journal of Physical Chemistry B* 104 6053 (2000)

- /BRS00/ M. Byrdin, I. Rimke, E. Schlodder, D. Stehlik und T. Roelofs: Decay Kinetics and Quantum Yields of Fluorescence in Photosystem I from *Synechococcus elongatus* with P700 in the Reduced and Oxidized State: Are the Kinetics of Excited State Decay Trap-Limited or Transfer-Limited?
Biophys. J. 79 992 (2000)
- /Hey01/ K. Heyne: Ultraschnelle Dynamik Protein-gesteuerter Reaktionen in Bakteriorhodopsin und bakteriellem Phytochrom.
Dissertation, Freie Universität Berlin, Voraussichtlicher Disputationstermin: Februar 2001.
- /HHS01/ K. Heyne, J. Herbst, D. Stehlik, R. Diller, B. Esteban, T. Lamparter und J. Hughes, Ultrafast Dynamics of Phytochrome from Cyanobacterium *Synechocystis*, reconstituted with Phycoerythrin (Cph1-PEB) and Phycoerythrobilin (Cph1-PEB). (Biophys. J.) in Vorbereitung.

Mitarbeiter Prof. Dr. D. Stehlik, Dr. R. Diller, Dipl. Phys. K. Heyne,
Dipl. Phys. J. Herbst, Dipl. Phys. M. Byrdin

Promotionen

- Byrdin, Martin "Messungen und Modellierungen zur Dynamik angeregter Zustände in Photosystem I", Dissertation, Freie Universität Berlin, (1999)
- Rimke, Ingo "Energie- und Ladungstransferkinetik in Photosystem II Kernkomplexen", Dissertation, Freie Universität Berlin (1999)
- Heyne, Karsten "Ultraschnelle Dynamik Protein-gesteuerter Reaktionen in Bakteriorhodopsin und bakteriellem Phytochrom"
Dissertation, Freie Universität Berlin; voraussichtlicher Disputationstermin: Februar 2001.

Herbst, Johannes "Untersuchung photoinduzierter, ultraschneller Reaktionen in Pigment-Protein-Komplexen mit Femtosekunden-Laserspektroskopie"

Hauptvorträge

Diller Impact of specific single and double mutants on the primary isomerization reaction in bacteriorhodopsin. Granada Sept. 99

Kurzvorträge und Posterpräsentationen: 8

DFG/MPG-Rundgespräch, European Science Foundation-ULTRA Meeting, DPG-Tagungen, ULTRAFast PHENOMENA, DFG-Kolloquium

Gastvortrag (Fachbereich Physik, FU Berlin)

Prof. G. Atkinson Picosecond Time-Resolved CARS on BR5.12 August 1999
Univ. of Arizona,
Tucson

Reiseberichte

Prof. Dietmar Stehlik 10. - 23. 6 1999 Gordon Research Conference on
Photosynthesis, Henniker N. H. USA

Nach meiner Ansicht bietet die Gordonkonferenz die bei weitem wirkungsvollste Gelegenheit, über den aktuellen Stand des Forschungsgebietes effizient die wichtigen Informationen einzuholen und vor allem neue Kooperationen in Gang zu bringen sowie laufende voranzutreiben. Highlights in unserem Forschungsbereich waren einerseits die Fortschritte bei der Strukturaufklärung von PS I und II; bei PS I konnten wir dazu selbst mit spektroskopischen Resultaten beitragen. Andererseits gab es Schlüsselerfolge in der Gen-Biochemie (genomics) zu hören, insbesondere bei der Biosynthese von Kofaktoren, die eine

gezielte und störungsfreie Modifikation der von uns untersuchten Kofaktorzustände in vivo gestattet. Dementsprechend gab es wichtige Kooperationsprojekte abzusprechen. Hierzu diente auch der anschließende Arbeitsaufenthalt (18. - 22.6.) an der Penn State University. Ein intensives Arbeitsprogramm mit Publikationsabschlüssen, Abstimmung von Forschungsanträgen und vor allem der Projektierung neuer Mutanten und Spinmarkierungspräparationen (einige neue Proben konnte ich bereits mitnehmen) konnte weitgehend abgearbeitet werden. Mit von der Partie in dieser Kooperation sind die Arbeitsgruppen an der Iowa State Univ., Chitnis (Mutageneses) und Struwe (Kurzzeitspektroskopie). Damit konnten auch für die in unserer Arbeitsgruppe laufenden Projekte zum Anregungsenergietransport in den Kernantennensystemen der Photosynthese sowie für die dazu geplanten Experimente im Kurzzeitbereich (Sfb 450) wichtige Planungsschritte erzielt und Kooperationsprojekte konkretisiert werden.

Vor der Konferenz (10. - 12.6.) wurden Arbeitsaufenthalte in Boston mit ebenfalls langjährigen Kooperationsgruppen realisiert: I. Y. Chan, Brandeis Univ. (Festkörper-Photoreaktionen) und D. Budil, North Eastern Univ. (Hochfeld-EPR und Spin Marker Einsatz in photosynthetischen Reaktionszentren).

Kooperationen (außerhalb des Sfb)

Die beschriebenen Projekte werden im Rahmen der folgenden Kooperationen durchgeführt, die uns biologisch gut charakterisierte Materialien sichern und den wissenschaftlichen Austausch substantiell erweitern.

Bakteriorhodopsin: Prof. M. Heyn, Dr. U. Alexiev (FU Berlin), Prof. M. Sheves (Weizmann Institut)

Insbesondere die Zusammenarbeit mit Prof. Sheves ermöglicht uns die zeitaufgelösten IR-Experimente an Bakteriorhodopsin mit "geblocktem" Chromophor. Während eines Besuches von Herr Sheves April 1999 bei uns haben wir die biochemische Seite des Projektes (Rekonstitution) und die physikalischen Aspekte eingehend diskutiert (vgl. Abschnitt B).

Phytochrom: Dr. T. Lamparter (FU Berlin), Prof. J. Huges (J. L. Univ. Giessen), PD Dr. G. Hermann (F.S. Univ. Jena)

