

**Untersuchung ultraschneller Strukturodynamik
photoschaltbarer Moleküle mittels
Femtosekunden-Infrarotspektroskopie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Karsten Neumann
aus Neumünster

Frankfurt 2010
D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen

Dekan	Prof. Dr. Dieter Steinhilber
1. Gutachter	Prof. Dr. Josef Wachtveitl
2. Gutachter	Prof. Dr. Bernd Brutschy
Datum der Disputation	13.12.2010

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Spektroskopische Grundlagen	5
2.2	UV/vis-Absorptionsspektroskopie	6
2.3	Infrarotspektroskopie	6
2.3.1	Normalmoden	7
2.3.2	H/D-Austausch	9
2.4	Relaxationsprozesse nach elektronischer Anregung	10
2.4.1	Einfluss der Relaxationsprozesse auf das Infrarotspektrum	11
2.5	Anreg-/Abtast-Spektroskopie	12
2.5.1	Transiente Absorptionsspektroskopie im mittleren Infraroten	13
2.5.2	Erzeugung ultrakurzer Laserpulse	14
2.5.3	Nichtlineare Optik	15
2.5.4	Weißlichterzeugung	22
2.5.5	Gruppengeschwindigkeitsdispersion	23
3	Das Experiment	27
3.1	Der Aufbau des IRMA-Experiments	27
3.1.1	Laser	27
3.1.2	Erzeugung der Anregungspulse im UV/vis-Bereich	29
3.1.3	Erzeugung der Abtastpulse im mittleren Infrarotbereich	34
3.1.4	Der Messplatz	37
3.1.5	Eliminierung von Störgrößen	48
3.2	Das Messprogramm	51
3.2.1	Funktionsumfang	52
3.2.2	Datenerfassung und -verarbeitung	53
3.2.3	Auswertung der transienten Absorptionsspektren	60
3.3	Effekte in fs-IR-Messungen	62
3.3.1	Gestörter freier Induktionszerfall	62
3.3.2	Kohärente Absorption von Gasen	64
3.3.3	Fabry-Perot-Etalon-Effekt	65
3.3.4	Kohärentes Artefakt: Kreuzphasenmodulation	66
3.4	Bestimmung von Zeitnullpunkt und Zeitauflösung	68
3.5	Der Autokorrelator	69

4	Nitrophenylacetat – photolabiles CO₂	73
4.1	Einleitung	73
4.2	Photochemie der Nitrophenylacetate	75
4.3	Ergebnisse der Ultrakurzzeitexperimente	78
4.3.1	Messbedingungen	78
4.3.2	Auftretende Effekte am Beispiel von m-NPA	80
4.3.3	Vergleich der Konstitutionsisomere und globale Analyse	87
4.4	Diskussion	98
4.5	Ausblick	102
5	Proteorhodopsin	105
5.1	Einleitung	105
5.2	Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Primärreaktion von PR	108
5.2.1	Probenpräparation	109
5.2.2	pH-Abhängigkeit des UV/vis-Absorptionsspektrums	109
5.2.3	Transiente Absorptionsspektroskopie im MIR-Bereich	110
5.2.4	Transiente Absorptionsspektroskopie im vis-Bereich	118
5.2.5	Diskussion	122
5.3	Untersuchung der Primärreaktion von PR-D97N	127
5.3.1	Probenpräparation	128
5.3.2	UV/vis-Absorptionsspektrum	128
5.3.3	Transiente Absorptionsspektroskopie im MIR-Bereich	129
5.3.4	Transiente Absorptionsspektroskopie im vis-Bereich	132
5.3.5	Diskussion	135
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	138
6	Das photoschaltbare Collagen-Modellpeptid	141
6.1	Einführung in photoschaltbare synthetische Peptide	141
6.2	Azobenzole als Photoschalter	142
6.2.1	Strukturen des Azobenzols	143
6.2.2	Photochemie des Azobenzols	144
6.2.3	Isomerisierungsmechanismus von Azobenzol	145
6.2.4	Vorüberlegungen zu Anreg-/Abtastexperimenten mit Azopeptiden	155
6.3	Einführung in das photoschaltbare Collagen-Modellpeptid	159
6.4	Lösungsmittel	163
6.5	Der Azoschalter	164
6.5.1	Experimentelle Bedingungen	165
6.5.2	Spektrale Charakterisierung und Voruntersuchungen	166
6.5.3	Transiente IR-Differenzspektren der <i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung	172
6.5.4	Transiente IR-Differenzspektren der <i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	190
6.6	Die photoschaltbare Collagen-Tripelhelix	200
6.6.1	Charakterisierung im sichtbaren Spektralbereich	201
6.6.2	Charakterisierung im infraroten Spektralbereich	205

6.6.3	Temperaturabhängigkeit der IR-Absorptionsspektren	216
6.6.4	Transiente IR-Differenzspektren der <i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung .	227
6.7	Fazit	243
7	Zusammenfassung	245
	Literaturverzeichnis	249

Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski Diagramm	12
2.2	Schema eines Anreg-/Abtastexperiments	13
2.3	Phasenanpassung in kollinear und nicht-kollinearer Anordnung	21
2.4	Laserpulse mit unterschiedlichem Chirp	24
3.1	Schema des NOPA	29
3.2	Schema des Prismenkompressors	31
3.3	Schema der Summenfrequenzerzeugung	32
3.4	Schema der MIR-Erzeugung	34
3.5	Spektren der MIR-Pulse	36
3.6	Schema des Messplatzes	38
3.7	Küvettdesign	42
3.8	Ansicht der Durchflusszelle	44
3.9	UV-Belichtung der Rotationsküvette	45
3.10	Computergesteuerte Rotationseinheit zur Polarisationskontrolle	47
3.11	Einfluss der Labortemperatur auf die MIR-Erzeugung	50
3.12	Analyse der MIR-Stabilität	51
3.13	Screenshots des Messprogramms: Einstellen der Schwellwerte	57
3.14	Störsignale infolge der Vibrationen des Unterbrecherrades	58
3.15	Schematische Darstellung des gestörten freien Induktionszerfalls	62
3.16	Simuliertes PFID-Signal	63
3.17	Einfluss der Absorptionsbanden von Gasen	65
3.18	Kreuzphasenmodulation	67
3.19	ZnSe-Signal zur Bestimmung des Zeitnullpunktes	69
3.20	Autokorrelator: Aufbau und Autokorrelationskurven	70
4.1	Photodecarboxylierungsreaktionen der Isomere des NPA	76
4.2	Absorptionsspektren von NPA und FTIR-Differenzspektrum der Photolyse von m-NPA	79
4.3	m-NPA und Puffer: 2d-Grafiken der transienten Absorptionsänderung mit Zuordnung der auftretenden Effekte	80
4.4	m-NPA und Puffer: Transienten ausgesuchter Wellenzahlen	81
4.5	CaF ₂ -Substrat: transiente Absorptionsänderung bei verschiedenen Anregungsbedingungen	82
4.6	m-NPA: transiente Spektren nach 1,8 ns und 20 ms, Freisetzung von CO ₂	84
4.7	Pulsverformung durch gasförmiges CO ₂	86

4.8	Vergleich der Produktspektren und Transienten der Isomere	87
4.9	m-NPA: globale Analyse für Anregung bei 290 nm mit 750 nJ	90
4.10	m-NPA, Anregung bei 290 nm mit 750 nJ: zerfallassozierte Spektren und Anpassungsparameter	90
4.11	m-NPA: globale Analyse für Anregung bei 258 nm mit 420 nJ	93
4.12	m-NPA, Anregung bei 258 nm mit 420 nJ: zerfallassozierte Spektren und Anpassungsparameter	93
4.13	o-NPA: globale Analyse für Anregung bei 258 nm mit 450 nJ	95
4.14	o-NPA, Anregung bei 258 nm mit 450 nJ: zerfallassozierte Spektren	95
4.15	p-NPA: globale Analyse für Anregung bei 290 nm mit 750 nJ	97
4.16	p-NPA, Anregung bei 290 nm mit 750 nJ: zerfallassozierte Spektren	97
5.1	Struktur von PR: Homologiemodell	106
5.2	Lichtinduzierte Isomerisierung des Retinals	107
5.3	PR: pH-Abhängigkeit der UV/vis-Absorptionsspektren	109
5.4	PR: 2d-Grafiken der transienten Absorptionsänderung im MIR	111
5.5	PR: transiente Spektren im MIR	112
5.6	PR: Transienten im MIR	113
5.7	PR: zerfallassozierte Spektren im MIR	115
5.8	PR: 2d-Grafiken der transienten Absorptionsänderung im vis	119
5.9	PR: Transienten im vis	120
5.10	PR: zerfallassozierte Spektren im vis	122
5.11	PR: Vergleich der DAS von $\tau_4 = \infty$ im vis und MIR	125
5.12	Analyse der PR _K –PR-Spektren im vis	126
5.13	Strukturformeln von Asp und Asn	128
5.14	PR-D97N: UV/vis-Absorptionsspektrum	129
5.15	PR-D97N: 2d-Grafiken der transienten Absorptionsänderung im MIR	130
5.16	PR-D97N: Transienten und DAS	130
5.17	PR-D97N: 2d-Grafik der transienten Absorptionsänderung im vis	133
5.18	PR-D97N: Transienten und DAS	134
5.19	ChR-2: transiente Absorptionsänderung im MIR	140
6.1	Anzahl der jährlichen Veröffentlichungen über Azobenzol	143
6.2	Reaktionspfade für Azobenzol	147
6.3	Azobenzol: Strukturen und Energieniveaudiagramm	156
6.4	Modell einer synthetischen Collagen-Tripelhelix	160
6.5	Illustration der lichtinduzierten Collagentfaltung	162
6.6	Strukturen von Azoschalter und -collagen	162
6.7	Azoschalter und -collagen: Infrarotspektren der Lösungsmittel	163
6.8	Azoschalter: Strukturoptimierung	164
6.9	Azoschalter: UV/vis-Absorptions- und Differenzspektren	166
6.10	Azoschalter: Einstellung des photostationären Gleichgewichtes	167
6.11	Azoschalter: IR-Absorptions- und Differenzspektren	170

6.12	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): 2d-Grafik der transienten Absorptionsänderung	174
6.13	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): Transiente Differenzspektren	175
6.14	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): Ausbleichkorrigierte Produktspektren	176
6.15	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): 2d-Grafiken mit dem Vergleich der globalen Anpassung mittels vier und zwei Zeitkonstanten	177
6.16	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): Transienten	178
6.17	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): Zerfallassozierte Spektren	180
6.18	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): Polarisationsabhängigkeit	188
6.19	Azoschalter (<i>cis</i> → <i>trans</i>): 2d-Grafik der transienten Absorptionsänderung	191
6.20	Azoschalter (<i>cis</i> → <i>trans</i>): Transiente Differenzspektren	192
6.21	Azoschalter (<i>cis</i> → <i>trans</i>): Transienten	193
6.22	Azoschalter (<i>cis</i> → <i>trans</i>): Zerfallassozierte Spektren	195
6.23	Azoschalter (<i>cis</i> → <i>trans</i>): Polarisationsabhängigkeit	198
6.24	Azocollagen: UV/vis-Absorptions- und Differenzspektren	201
6.25	Azocollagen: UV/vis-Spektren wiederholter Aufheizperioden	203
6.26	Azocollagen: Einfluss von HDO auf das IR-Absorptionsspektrum	206
6.27	Azocollagen: IR-Absorptions- und Differenzspektren	207
6.28	Azocollagen: Struktur der charakteristischen Aminosäuresequenz	213
6.29	Azocollagen: Feinstruktur der IR-Absorptionsspektren	214
6.30	HDO: Temperaturabhängigkeit der IR-Absorptionsspektren	217
6.31	Azocollagen: Temperaturabhängigkeit der IR-Absorptionsspektren bei 3400 cm ⁻¹	218
6.32	Azocollagen: IR-Schmelzkurven im Amid A-Bereich	219
6.33	Azocollagen: Temperaturabhängigkeit der IR-Absorptionsspektren	220
6.34	Azocollagen: 2d-Grafiken der thermisch induzierten IR-Differenzspektren	222
6.35	Azocollagen: IR-Schmelzkurven im Bereich der Peptidbanden	223
6.36	Azocollagen: thermisch induziertes, irreversibles Differenzspektrum	226
6.37	Azocollagen (50 °C): 2d-Grafik der transienten Absorptionsänderung	229
6.38	Azocollagen (<i>trans</i> → <i>cis</i> , 50 °C): Transiente Differenzspektren	229
6.39	Vergleich transienter Spektren (1 ps) von Azoschalter und -collagen	230
6.40	Azocollagen (<i>trans</i> → <i>cis</i> , 50 °C): Transienten	231
6.41	Azocollagen (<i>trans</i> → <i>cis</i> , 50 °C): Zerfallassozierte Spektren	233
6.42	Azocollagen (20 °C): 2d-Grafik der transienten Absorptionsänderung	235
6.43	Azocollagen (<i>trans</i> → <i>cis</i> , 20 °C): Transiente Differenzspektren	235
6.44	Azoschalter und -collagen: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der transienten Absorption im Amid I-Bereich (2d-Grafik)	236
6.45	Azocollagen (<i>trans</i> → <i>cis</i> , 20 °C): Transienten	238
6.46	Azocollagen (<i>trans</i> → <i>cis</i> , 20 °C): Zerfallassozierte Spektren	239
6.47	Azocollagen: transiente Spektren im Amid II-Bereich	240
6.48	Azocollagen: Polarisationsabhängigkeit	241

Tabellenverzeichnis

2.1	Phasenanpassung in uniaxialen Kristallen	20
3.1	Übersicht der verwendeten optisch nichtlinearen Kristalle	37
3.2	Verfügbare Gitter des Spektrometers	40
4.1	NPA: Zeitkonstanten aus der globalen Analyse	98
5.1	Zeitkonstanten der globalen Analyse der fs-IR-Messung von PR	114
5.2	Zeitkonstanten der globalen Analyse der fs-vis-Messungen von PR in H ₂ O und D ₂ O	121
5.3	Modellierung des PR _K –PR-Differenzspektrums im vis-Bereich	126
5.4	Zeitkonstanten der globalen Analyse der fs-IR-Messungen von PR-D97N	132
5.5	Zeitkonstanten der globalen Analyse der fs-vis-Messungen von PR-D97N und PR	134
5.6	Kinetische Isotopeneffekte verschiedener PR-Proben	137
6.1	Isomerisierungsquantenausbeute von Azobenzol	145
6.2	Azoschalter: Anregungswahrscheinlichkeiten der Isomere	169
6.3	Azoschalter: Zuordnung der IR-Banden	171
6.4	Azoschalter (<i>trans</i> → <i>cis</i>): Anisotropie	189
6.5	Azoschalter (<i>cis</i> → <i>trans</i>): Anisotropie	199
6.6	Azocollagen: IR-Banden	208
6.7	Azocollagen: Zuordnung der IR-Feinstruktur	215
6.8	Azocollagen und Azoschalter: Anisotropie	242

Abkürzungsverzeichnis

λ_{Bl}	Blazewellenlänge, optimierte Wellenlänge eines geritzten Gitters
d	Gitterkonstante: Anzahl Gitterfurchen pro mm
AB	Azobenzol (Diphenyldiazin)
Ac	Acetylgruppe
ADC	engl.: Analog-Digital-Converter (Analog-Digital-Wandler)
AgGaS ₂	Silberthiogallat
AMPB	4-(4'-Aminomethylphenylazo)benzoat
AOM	Akustooptischer Modulator
APB	4-(4'-Aminophenylazo)benzoat
AR	Antireflex(-beschichtung)
ATP	Adenosintriphosphat
BBAR	breitbandige Antireflexbeschichtung
BBO	β -Bariumborat (β -BaB ₂ O ₄)
BPR	blau absorbierendes Proteorhodopsin
BR	Bakteriorhodopsin
Chopper	Unterbrecherrad
ChR-2	Channelrhodopsin-2
CPA	engl.: Chirped Pulse Amplification/Amplifier
DDM	n -Dodecyl- β -D-Maltosid
DFG	engl.: Difference Frequency Generation (Differenzfrequenzerzeugung)
DMSO	Dimethylsulfoxid (C ₂ H ₆ SO)
EG- d_6 :D ₂ O	Gemisch (1:1) aus Ethylenglykol- d_6 und D ₂ O
FID	freier Induktionszerfall
FIFO	engl.: First In First Out (Datenspeicher)
FROG	engl.: Frequency Resolved Optical Gating
FWHM	engl.: Full Width at Half Maximum (volle Halbwertsbreite)
Gly	Glycin
GPR	grün absorbierendes Proteorhodopsin
HR	Halorhodopsin
Hyp	4(R)-Hydroxy-L-Prolin
InGaAs	Indiumgalliumarsenit
IRMA	InfraRotMessAnlage
ISC	engl.: Intersystem Crossing (Interkombination)
IVR	engl.: Internal Vibrational Redistribution, (interne Schwingungsenergieumverteilung)
KTP	Kaliumtitanylphosphat

MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellurid, HgCdTe
MIR	mittlerer infraroter Spektralbereich: 2,5 μm – 50 μm (200 cm^{-1} – 4000 cm^{-1})
NaPi	Natriumphosphatpuffer
ND-Filter	Neutralglasfilter
Nd:YAG	Neodym-dotiertes (Nd^{3+}) Yttriumaluminiumgranat ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$)
NOPA	nichtkollinearer optisch parametrischer Verstärker
NPA	Nitrophenylacetat
OPA	optisch parametrischer Verstärker
p-coating	Oberflächenschutzbeschichtung
PFID	engl.: Perturbed Free Induction Decay (gestörter freier Induktionszerfall)
PPLN	periodisch gepoltes Lithiumniobat (LiNiO_3)
PR	Proteorhodopsin, grün absorbierende Variante aus SAR 86
PRD97N	PR-Mutante bei der das Aspartat (Einbuchstabencode: D) an Position 97 durch ein Asparagin (Einbuchstabencode: N) ersetzt wurde
Pro	L-prolin
PTFE	Polytetrafluorethylen, bekannt unter dem Markennamen <i>Teflon</i>
RLD	reziproke lineare Dispersion (des Gitterspektrometers)
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SFG	engl.: Sum Frequency Generation (Summenfrequenzerzeugung)
SHG	engl.: Second Harmonic Generation (Frequenzverdopplung)
SPIDER	engl.: Spectral Phase Interferometry for Direct Electric field Recon- struction
SRI	Sensorrhodopsin I
SR II	Sensorrhodopsin II
SVEA	engl.: Slowly Varying Envelope Approximation
THG	Frequenzverdreifung
Ti:Sa	Titan-dotierter (Ti^{3+}) Saphir (Al_2O_3)
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TTL	Transistor-Transistor-Logik: „0“: $\approx 0\text{ V}$ und „1“: $\approx 5\text{ V}$
UV	ultravioletter Spektralbereich: 200 nm – 400 nm (25000 cm^{-1} – 50000 cm^{-1})
vis	sichtbarer Spektralbereich: 400 nm – 750 nm (13000 cm^{-1} – 25000 cm^{-1})
XPM	engl.: Cross Phase Modulation (Kreuzphasenmodulation)
ZAP-SPIDER	engl.: Zero Additional Phase shift Spectral Phase Interferometry for Direct Electric field Reconstruction
ZnSe	Zinkselenid

1 Einleitung

Planung ersetzt Zufall durch Irrtum

(Albert Einstein)

Die Umwandlung, der Transport und der Einsatz von Energie zur Verrichtung von Arbeit waren schon immer von besonderem Interesse für die Menschheit. Seit der Erfindung der Dampfmaschine und der damit verbundenen industriellen Revolution hat sich der Fokus der Forschung zunehmend auf das fundamentale Verständnis der zugrundeliegenden chemischen Abläufe auf molekularer Ebene verlagert. Diese Entwicklung wird deutlich, wenn man die aktuelle Literatur mit der vor 130 Jahren vergleicht.

Am 03. Juli 1880 erschien in New York eine neue Zeitschrift, die wöchentlich über den wissenschaftlichen Fortschritt berichten sollte: „SCIENCE“. In der Begrüßungsansprache äußerte Herausgeber John Michels den Wunsch, dass SCIENCE in den USA dieselbe Position einnehmen möge, wie *Nature* in England [1]. Die ersten Aufsätze beschäftigten sich mit Erzeugung, Transport und Anwendung elektrischer Energie im großen Maßstab: für Kraftmaschinen in elektrisch angetriebenen Eisenbahnen [2] oder die Beleuchtung von Stadtteilen [3]. Inzwischen sind die Visionen jener Autoren Realität geworden: SCIENCE ist eine der international wichtigsten, wissenschaftlichen Zeitschriften und elektrische Beleuchtung ist genauso selbstverständlich wie der Elektroantrieb in Hochgeschwindigkeitszügen oder der U-Bahn. Aktuellere SCIENCE-Artikel behandeln dagegen nicht mehr die Entwicklung von Elektromotoren, sondern die Funktion von Motoren und Maschinen, die aus einzelnen Molekülen bestehen [4, 5]. Vorbild für diese Anwendungen sind die ausgefeilten Proteinmotoren, die die Bewegungen in lebenden Zellen ermöglichen [6–8]. Anstelle der Stromversorgung ganzer Stadtteile werden heutzutage z. B. die einzelnen Elektronentransferschritte im Enzym *Cytochrom c Oxidase* [9] verfolgt.

Grundlage für dieses Interesse am Mikrokosmos ist die Erkenntnis, dass die Natur biochemische Reaktionen hervorgebracht hat, die sehr spezifisch und hocheffizient ablaufen und deren Verständnis somit von fundamentalem Interesse ist. In vielen dieser Einzelreaktionen spielen molekulare Schalter eine zentrale Rolle [10–16]. Diese Moleküle existieren in zwei unterschiedlichen, stabilen Zuständen, welche sich reversibel und gezielt ineinander umwandeln lassen. Eine Untergruppe der molekularen Schalter sind photochrome Systeme, bei denen die Transformation mindestens in einer Richtung lichtinduziert stattfindet und sich beide Zustände in ihren spektralen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Deswegen bezeichnet man solche Stoffe auch als photoschaltbare Moleküle oder kurz als Photoschalter. Die bei photochromen Systemen auftretenden Reaktionen sind z. B. Ladungstransfer, Ringöffnung bzw. -schluss und Isomerisierung an Doppelbindungen. Bekannte Proteine, deren Funktionen auf Photoschaltern beruhen,

sind Phototropine, Phytochrome und Retinalproteine. Als ein photochromer Prozess sei hier lediglich die lichtinduzierte 11-*cis* → all-*trans*-Isomerisierung des Retinals im Rhodopsin in der Retina des menschlichen Auges genannt, die einen wichtigen Teil des Sehprozesses darstellt. Die Evolution hat hier offensichtlich molekulare Schalter hervorgebracht, die spezifisch, effizient und mit hoher Zykluszahl biochemische Reaktionen steuern. Mit der lichtinduzierten Auslösung der Reaktion und der spektralen Unterscheidbarkeit der photochromen Zustände kann der Reaktionsverlauf spektroskopisch hervorragend charakterisiert werden.

Das zugrundeliegende Prinzip kann man ebenso für die Untersuchung von Proteinen und Peptiden ohne natürliches Chromophor ausnutzen. Dabei wird ein artifizierender molekularer Schalter an die interessierende Spezies gekoppelt und erlaubt so beispielsweise die lichtgesteuerte Kontrolle von Proteinaktivität [17], DNA-Bindung [18, 19] oder die Kontrolle der Konformation von Peptiden [20–24]. Einige wichtige Beispiele für künstliche Photoschalter zur Kontrolle von Peptiden sind:

- Ableitungen des Retinals, die über eine protonierte Schiff'sche Base kovalent gebunden werden [25]
- Thioamide, die sich als Aminosäuren direkt in das Peptid-Rückgrat integrieren lassen und dessen Struktur nur minimal stören [21]
- Hemithio-Indigo basierte Photoschalter, die als künstliche Aminosäuren in das Peptid-Rückgrat eingebaut werden [26]
- Azobenzol basierte Photoschalter, die entweder ins Rückgrat des Peptids eingebaut werden oder über die Seitenketten mit dem Peptid verbunden werden [23, 24, 27]

Neben den bisher erwähnten, reversibel schaltenden Systemen hat sich eine weitere Methode zur Untersuchung biochemischer Reaktionen etabliert: der Einsatz photolabiler Schutzgruppen, sogenannter *caged compounds*. Bei diesen wird mit Hilfe eines Lichtpulses eine zuvor inaktive chemisch oder biologisch relevante Substanz freigesetzt, die dann wiederum die interessierende Reaktion auslöst. Dieser Prozess ist im Allgemeinen irreversibel, so dass *caged compounds* streng genommen nicht zu den Photoschaltern zählen.

Die Erforschung künstlicher photochromer Systeme und molekularer Schalter ist ein eigenständiges und wachsendes Forschungsfeld [28–31]. Es finden sich Anwendungen als optische Speichermedien und optronische Logik-Bausteine [32–40] sowie in der Herstellung zwei- oder dreidimensionaler Strukturen, die sich mit Licht manipulieren lassen [27, 41–44]. Weiterhin konnte in der Fluoreszenzmikroskopie durch die Verwendung von Molekülen mit schaltbaren Emissionseigenschaften eine Auflösung von unter 20 nm realisiert werden [45, 46].

In dieser Arbeit wurde zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie eingesetzt, um die Struktur­dynamik verschiedener artifizier­ter sowie natürlicher photoschaltbarer Systeme zu untersuchen. Eine detaillierte Einführung in die jeweilige Fragestellung ist jedem Kapitel vorangestellt, so dass an dieser Stelle darauf verzichtet werden kann.

- Die drei Konstitutionsisomere des Nitrophenylacetats gehören zur Gruppe der *caged compounds*. Hier wird nach Anregung mit ultraviolettem Licht die Abspaltung von CO₂ beobachtet. Die damit induzierte Erhöhung der CO₂-Konzentration kann dann wiederum in der Untersuchung von CO₂-abhängigen, enzymatischen Reaktionen verwendet werden.
- Mit der Charakterisierung der Chromophorisomerisierung im bakteriellen Retinalprotein Proteorhodopsin wird ein natürliches photochromes System untersucht.
- Die Seitenkettenverbrückung einer Peptidsequenz mit einem Azobenzol-basierten künstlichen Photoschalter wurde ausgenutzt, um die lichtgesteuerte Entfaltung eines synthetischen Modellcollagens zu ermöglichen. Sowohl der verwendete Photoschalter als auch die gekoppelte Sequenz werden spektroskopisch charakterisiert.

2 Theoretische Grundlagen

The difference between theory and practice is, that in theory there is no difference between theory and practice, but in practice there is.

(Lawrence Peter Berra, „Yogi“)

Durch die Untersuchung mit Licht oder von Licht lässt sich viel wertvolles Wissen über unsere Umwelt erlangen. Informationen über ferne Galaxien oder Abläufe in unserer Sonne können beispielsweise nur auf diesem Wege erhalten werden, eine Untersuchung mit anderen Methoden ist ausgeschlossen. Als Licht bezeichnet man dabei das gesamte elektromagnetische Spektrum von der langwelligen kosmischen Hintergrundstrahlung bis zu den energiereichen γ -Quanten der Kernzerfälle. Entsprechend vielfältig sind die auftretenden physikalischen Phänomene und Messmethoden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit zeitaufgelöster Spektroskopie im infraroten und sichtbaren Spektralbereich, deshalb werden im Folgenden einige wichtige Prinzipien dargelegt, soweit sie zum Verständnis notwendig sind.

2.1 Spektroskopische Grundlagen

Allgemeine Grundkenntnisse über die Absorptionsspektroskopie werden vorausgesetzt und können bei Bedarf in entsprechenden Lehrbüchern nachgeschlagen werden. Dieser Abschnitt dient insofern nur der Festlegung einiger Begrifflichkeiten.

Damit eine Absorption der Lichtquanten durch die untersuchte Probe stattfinden kann, muss die Energie der Photonen resonant mit einem erlaubten Übergang zwischen besetzten und unbesetzten molekularen Energieniveaus sein. Für die Photonenenergie E gilt:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\tilde{\nu} \quad (2.1)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum $h = 6,626 \times 10^{-34}$ Js und der Lichtgeschwindigkeit $c = 2,99 \times 10^8$ m/s. Die Energie der Lichtquanten kann also durch unterschiedliche Messgrößen charakterisiert werden. In der UV/vis-Spektroskopie ist die Angabe der Wellenlänge λ in der Einheit nm üblich, während in der IR-Spektroskopie meist die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in der Einheit cm^{-1} verwendet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden

Experimente in den Spektralbereichen des ultravioletten¹ und sichtbaren² sowie des mittleren infraroten³ Lichtes durchgeführt.

2.2 UV/vis-Absorptionsspektroskopie

Die Absorption von Licht im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich führt zur Anregung von Valenzelektronen. Die erlaubten Übergänge lassen sich anhand der beteiligten Molekülorbitale klassifizieren. Man unterscheidet bindende σ - und π -, nichtbindende n - sowie antibindende σ^* - und π^* -Orbitale. Neben der Energieerhaltung ergeben sich weitere Auswahlregeln: Aus der Erhaltung des Gesamtspins S ergibt sich, dass nur Übergänge derselben Multiplizität ($M = 2S + 1$) erlaubt sind. Ist der Gesamtspin des elektronischen Grundzustands gleich Null, dann sind nur Übergänge innerhalb des Singulettsystems erlaubt. In diesem Sinne bedeutet $S_1(n\pi^*)$ -Zustand: Anregung eines Elektrons aus einem n -Orbital des elektronischen Grundzustands in ein π^* -Orbital, was dem ersten elektronisch angeregten Singulettzustand entspricht.

Eine wichtige Größe, die den Übergang eines Moleküls aus dem Zustand i in den Zustand k charakterisiert, ist das Übergangsdipolmoment μ_{ik} :

$$\mu_{ik} = \int \psi_i^* \mu \psi_k d\tau \quad (2.2)$$

Hierbei sind μ der elektrische Dipoloperator und ψ_i, ψ_k die elektronischen Wellenfunktionen der beiden Zustände.

Bei dem Übergangsdipolmoment handelt es sich um eine vektorielle Größe und die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs ist proportional zum Betragsquadrat $|\mu_{ik}|^2$. Für linear polarisiertes Licht ist die Wahrscheinlichkeit der Absorption durch ein Molekül maximal, wenn der elektrische Feldvektor und das molekulare Übergangsdipolmoment parallel orientiert sind und Null, wenn beide senkrecht aufeinander stehen. Dazwischen ergibt sich eine \cos^2 -Verteilung. Die Verwendung von polarisiertem Licht führt also zu einer bevorzugten Absorption durch Moleküle mit einer bestimmten räumlichen Orientierung.

2.3 Infrarotspektroskopie

Im infraroten Spektralbereich lassen sich die Übergänge zwischen den Schwingungsniveaus eines Moleküls beobachten. Voraussetzung für die Anregung einer Schwingung durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung ist, dass die Schwingung mit einer Änderung des molekularen Dipolmoments verbunden ist.

¹UV: 200 nm bis 400 nm (25000 cm^{-1} – 50000 cm^{-1})

²vis: 400 nm bis 750 nm (13000 cm^{-1} – 25000 cm^{-1})

³MIR: $2,5 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ (200 cm^{-1} – 4000 cm^{-1})

Im einfachsten Fall kann man ein zweiatomiges Molekül betrachten, welches als quantenmechanischer harmonischer Oszillator beschrieben wird. Man erhält die Grundschwingungsfrequenz ν als:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.3)$$

mit der Kraftkonstanten k und der reduzierten Masse $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$. Daraus ergeben sich mit der Schwingungsquantenzahl $v = 0, 1, 2, \dots$ und dem Planckschen Wirkungsquantum h die Schwingungsenergieeigenwerte als:

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu \quad (2.4)$$

In der harmonischen Näherung sind nur Übergänge mit $\Delta v = \pm 1$ erlaubt, was Energiedifferenzen von $\Delta E = h\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$ entspricht. Daran kann man leicht nachvollziehen, dass die Wellenzahl eines solchen Schwingungsübergangs empfindlich von der Kraftkonstante der Bindung und den Massen der Atome abhängt.

Die zugrundegelegte Annahme einer linearen Rückstellkraft ist jedoch eine sehr grobe Näherung, eine realistischere Beschreibung liefert das empirisch gefundene *Morse-Potential*:

$$V(r) = D_e \left[1 - e^{a(r_e - r)} \right]^2 \quad \text{mit: } a = \sqrt{\frac{k_e}{2D_e}} \quad (2.5)$$

mit dem Gleichgewichtsabstand r_e , der auf das Minimum der Potentialkurve bezogenen Dissoziationsenergie D_e und einer Konstante a , die sich aus der Kraftkonstante im Minimum und der Dissoziationsenergie ergibt. Die Energieniveaus dieses anharmonischen Oszillators sind nicht mehr äquidistant, ihr Abstand nimmt bei steigender Schwingungsquantenzahl v ab. Außerdem sind nun Übergänge mit $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ erlaubt, was zur zusätzlichen Absorption bei Obertönen im Infrarotspektrum führt.

2.3.1 Normalmoden

Betrachtet man Moleküle aus N Atomen, dann besitzen lineare $3N - 5$ und nicht-lineare Moleküle $3N - 6$ interne Freiheitsgrade, die Normalschwingungen. Die übrigen 5 bzw. 6 Freiheitsgrade beschreiben die Translation und die Rotation des gesamten Moleküls im Laborkoordinatensystem. In der harmonischen Näherung stellen die Normalmoden eine orthogonale Basis zur Lösung der Bewegungsgleichung der Atome dar, sie sind also vollständig entkoppelt. Bei Betrachtung eines anharmonischen Potentials gilt dies jedoch nicht mehr, die auftretenden anharmonischen Kopplungen führen zu Resonanzeffekten und Kombinationsschwingungen, die ebenfalls im Infrarotspektrum auftreten. Die anharmonische Kopplung an niederfrequente Schwingungsmoden kann zu einer ausgeprägten Temperaturabhängigkeit der gemessenen Absorptionsbanden führen. Ebenso beeinflusst die Wechselwirkung mit Lösungsmittelmoden die Lage einer Infrarotabsorptionsbande und derartige Effekte sind bei der Auswertung der Spektren zu berücksichtigen.

Trotz der Vielzahl an möglichen Schwingungsmoden und -frequenzen zeichnet sich die Infrarotspektroskopie durch eine hohe Struktursensitivität aus. Oberhalb von 1500 cm^{-1} lassen sich Bereiche des Spektrums unterscheiden, die charakteristisch für bestimmte funktionelle Gruppen sind. Darüberhinaus können auch geringe Änderungen von Bindungskräften und -längen nachgewiesen oder Schwingungsfrequenzen bestimmter Gruppen durch Isotopenmarkierung identifiziert werden.

Besonders wichtig für die Untersuchung von Peptiden und Proteinen sind die Normalschwingungen der Peptidbindungen. Bei einigen Moden hängt die Kopplung zwischen den Schwingungen benachbarter Peptidbindungen von der Konformation des Rückgrats ab, so dass sich aus dem Infrarotspektrum oft Informationen über die Sekundärstruktur ableiten lassen. Hier werden nur die vier hochfrequentesten Normalmoden der Peptidgruppe vorgestellt [47–49].

Amid A- und Amid B-Mode

Diese Schwingungsmoden entsprechen der N–H-Streckschwingung $\nu(\text{N–H})$ und liegen bei $\tilde{\nu} \approx 3300\text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu} \approx 3070\text{ cm}^{-1}$. Sie koppeln nicht mit anderen Moden des Peptidrückgrats, sind also nicht konformationssensitiv, reagieren jedoch auf Änderungen in der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung.

Amid I

Die Amid I-Mode entspricht der C=O-Streckschwingung $\nu(\text{C=O})$ mit geringen Beiträgen anderer Schwingungen und liegt typischerweise zwischen 1630 cm^{-1} und 1690 cm^{-1} . Aufgrund der Kopplung mit den Streckschwingungen benachbarter Peptid-Carbonylgruppen wird ihre Frequenz maßgeblich durch die Konformation des Rückgrats, also die Winkel ϕ und ψ beeinflusst. Daher kann aus der Bandenposition und -form meist auf die Sekundärstruktur eines Proteins geschlossen werden. Beispielsweise findet sich bei α -helikalen Proteinen nur eine Bande bei etwa 1650 cm^{-1} , während das Spektrum einer β -Faltblattstruktur in diesem Bereich wegen der Kopplung der Übergangsdipolmomente⁴ in zwei Banden bei etwa 1630 cm^{-1} und 1685 cm^{-1} aufspaltet. Die Kopplung mit der N–H-Beugeschwingung führt beim H/D-Austausch an der Aminogruppe zu einer leichten Rotverschiebung der Amid I-Bande von bis zu 10 cm^{-1} .

Amid II-Mode

Diese entsteht durch die gegenphasige Kombination aus N–H-Beugeschwingung $\delta_s(\text{N–H})$ und C–N-Streckschwingung $\nu(\text{C–N})$ mit geringen Beiträgen weiterer Gruppen. Die Absorptionsbande liegt bei etwa 1550 cm^{-1} . Die Amid II-Mode zeigt ebenfalls eine starke Abhängigkeit von der Konformation des Peptidrückgrats, allerdings ist eine direkte Ermittlung der Sekundärstruktur aus ihrer Bandenform meist nicht möglich. Die Deuterierung der Amidgruppe verändert die reduzierte Masse der N–D-Gruppe. Wegen

⁴engl.: Transition Dipole Coupling

der damit verbundenen Frequenzverschiebung sind die $\delta_s(\text{N-D})$ - und $\nu(\text{C-N})$ -Schwingungen entkoppelt, man bezeichnet die entstandene Normalschwingung als Amid II'-Mode. Ihre Schwingungsfrequenz wird durch die C-N-Streckschwingung bestimmt und sie liegt zwischen 1460 cm^{-1} und 1490 cm^{-1} .

Amid III

Die Amid III Schwingungsmode entsteht durch die phasengleiche Kombination aus N-H-Beugeschwingung $\delta_s(\text{N-H})$ und C-N-Streckschwingung $\nu(\text{C-N})$ mit geringen Beiträgen weiterer Gruppen. Sie absorbiert im Spektralbereich von 1200 cm^{-1} bis 1400 cm^{-1} und hängt von der Konformation der Peptidbindung, aber auch von der Struktur der Seitenketten ab. Die N-H-Beugeschwingung ist Teil vieler Normalmoden im diesem Spektralbereich. Bei Deuterierung der Amidgruppe entkoppeln die $\delta_s(\text{N-D})$ - und $\nu(\text{C-N})$ -Schwingungen, es wird keine Amid III-Signatur mehr beobachtet.

2.3.2 H/D-Austausch

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Deuterierung der Amidgruppe einen großen Einfluss auf die Frequenzen ihrer Normalmoden hat. Die mit einer solchen Deuterierung verbundenen Prozesse sollen hier noch einmal im Detail vorgestellt werden.

Zur Aufnahme von Infrarotspektren von Peptiden und Proteinen wird häufig D_2O als Lösungsmittel verwendet, da der wichtige Amid I-Bereich in H_2O nicht zugänglich ist. In der Folge kommt es zu Austauschreaktionen der Wasserstoffisotope ($^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$, H/D-Austausch) an Seitenketten und der Aminogruppe des Peptidrückgrats. Die Rate dieser Säure-Base-Reaktion ist allgemein abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert. Die Aminogruppe eines Peptids ist ein Ampholyt und kann sowohl sauer als auch basisch reagieren. Durch die anschließende sehr schnelle Rückreaktion mit dem Lösungsmittel wird der Ausgangszustand wieder hergestellt. Wegen des im Überschuss vorliegenden Deuteriums erfolgt so der quantitative Austausch aller zugänglichen Protonen gegen Deuterium. Die basenkatalysierte Deprotonierung bzw. die säurekatalysierte Protonierung ist hier der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [50, 51]. Das wird z. B. in Quenching-Experimenten benutzt, um durch eine schnelle Änderung des pH-Wertes die Austauschreaktion um mehrere Größenordnungen zu verlangsamen. Auf diese Weise lassen sich die *eingefrorenen* Zustände der schnellen Protonenaustauschreaktionen mittels NMR- oder auch Massenspektroskopie untersuchen [52]. Es werden auch nicht alle Protonen eines Peptids ausgetauscht, beispielsweise wird eine solche Reaktion bei CH oder CH_2 Gruppen generell nicht beobachtet.

Außerdem hängt die Austauschrate einer Gruppe von ihrer Umgebung ab: Wasserstoffbrückenbindungen und die Zugänglichkeit zum Lösungsmittel spielen eine wesentliche Rolle, aber auch die vorhandenen Seitenketten [53, 54]. Bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert erfolgt der Protonenaustausch aller lösungsmittlexponierten freien Aminogruppen innerhalb weniger Minuten. Für Amid-Protonen in strukturierten nicht zugänglichen Teilen von Proteinen ist der Austausch teilweise auch nach mehreren Tagen

noch nicht abgeschlossen [48, 49, 55–57]. Selbst solvensexponierte Amid-Protonen sind teilweise gegen den H/D-Austausch geschützt. Für kleine Moleküle wurde eine Verringerung der Rate durch Wasserstoffbrückenbindung um nahezu sechs Größenordnungen gezeigt [55].

Die Beobachtung des H/D-Austausches stellt eine elegante Möglichkeit dar um die dreidimensionale Struktur und Flexibilität von Peptiden und Proteinen zu untersuchen. Die Infrarotspektroskopie ist besonders geeignet um das Fortschreiten der Austauschreaktion zu verfolgen [55, 56, 58], da der Isotopentausch mit einer charakteristischen Frequenzverschiebung der zugehörigen Banden verbunden ist. Häufig wird die Intensitätsabnahme der Amid II-Bande als Indikator für den Grad der Deuterierung betrachtet, da sie eine große Verschiebung von etwa 100 cm^{-1} aufweist (Amid II \rightarrow Amid II').

Zustandsänderungen wie beispielsweise die Entfaltung von Proteinen beeinflussen die Austauschbarkeit zuvor geschützter Protonen massiv. So können Gruppen, die bei Raumtemperatur unzugänglich sind, nach der Entfaltung deuteriert werden. Häufig ist die Austauschrate schneller als die Entfaltungskinetik, dann kann die Entfaltung im Infrarotbereich in Echtzeit verfolgt werden [57].

Bei diesen Experimenten ist auch der Einfluss auf das Lösungsmittel zu bedenken. Durch den H/D-Austausch von D_2O entsteht HDO. Dabei führen nicht nur die ausgetauschten Protonen der Probe selbst, sondern auch gebundene Wassermoleküle zur Erhöhung der HDO-Konzentration. Dessen Absorptionsbanden bei 3400 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} überlagern das Spektrum im Bereich der Amid A-, Amid B-, und Amid II'-Banden. Kann man die Konzentration von H_2O und HDO bestimmen, dann lassen sich die gemessenen Spektren entsprechend korrigieren [59].

2.4 Relaxationsprozesse nach elektronischer Anregung

Die Absorption des Anregungsphotons führt zunächst zu einer nicht-thermischen Besetzung hochfrequenter Schwingungsmoden in der Franck-Condon-Region des elektronisch angeregten Zustands. Die durch das Molekül aufgenommene Photonenenergie wird nun durch unterschiedliche strahlungslose und strahlende Prozesse wieder abgegeben. Dies ist im Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden näher erläutert.

Am schnellsten ist in der Regel die intramolekulare Schwingungsenergieumverteilung (IVR⁵). Dabei wird die Energie der angeregten hochfrequenten Moden an die niederfrequenten Schwingungen des Moleküls umverteilt. Gleichzeitig ändert sich die molekulare Geometrie, so dass durch interne Konversion sehr schnell der niedrigste elektronisch angeregte Zustand erreicht wird. Das ist die Ursache für die Beobachtung, dass Fluoreszenz oder photochemische Reaktionen meist unabhängig von der Anregungsenergie vom niedrigsten elektronisch angeregten Zustand gegebener Spinmultiplizität ausgehen. Man bezeichnet dies auch als *Kashas Regel* [60, 61].

⁵engl.: Internal Vibrational Redistribution

Von hier aus kann die Energie z. B. unter Emission eines Photons oder strahlungslos durch Energieabgabe an die Umgebung wieder abgegeben werden, wobei höhere Schwingungsniveaus des Moleküls in der ursprünglichen Grundzustandgeometrie bevölkert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Teilnahme an einer chemischen Reaktion, wobei eine veränderte Struktur im Grundzustand eingenommen wird. Beispiele sind Isomerisierungen, intra- oder intermolekulare Ladungs- oder Protonentransferreaktionen, das Öffnen oder Schließen von Ringsystemen oder auch die Dissoziation des Moleküls. Bei allen strahlungslosen Prozessen wird die Exzessenergie zunächst intramolekular auf die Schwingungsmoden des Moleküls und letztendlich auch intermolekular auf die des Lösungsmittelbades übertragen.

Abhängig von der molekularen Struktur kann ebenfalls ein Übergang in den Triplettzustand erfolgen (Interkombination⁶). Dieser ist mit einer optisch verbotenen Spinkkehr verbunden. Die Anwesenheit von Schweratomen oder bestimmter funktioneller Gruppen (z. B. Nitrofunktionalitäten) mit hoher Spin-Bahn-Kopplung kann dieses jedoch stark begünstigen. Auch hier kommt es zur schnellen Relaxation in den niedrigsten T_1 -Zustand, welcher wiederum strahlungslos über die oben genannten Mechanismen oder langsam über Phosphoreszenz deaktiviert werden kann.

2.4.1 Einfluss der Relaxationsprozesse auf das Infrarotspektrum

Die elektronische Anregung eines Moleküls hat einen starken Einfluss auf die Absorptionsbanden im infraroten Spektralbereich, da sich die Potentiale des angeregten und des Grundzustandes hinsichtlich der Kraftkonstanten und Gleichgewichtsabstände grundlegend unterscheiden. Zudem ist mit der elektronischen Anregung meist die Anregung hochfrequenter Schwingungsmoden verbunden, die aufgrund des anharmonischen Potentials rotverschoben absorbieren.

Mit der IVR wird die Schwingungsenergie dieser Franck-Condon-Moden an niederfrequente Schwingungen und teilweise bereits an das Lösungsmittel abgegeben. Die anharmonische Kopplung dieser angeregten niederfrequenten Moden führt bei den beobachteten hochenergetischen Schwingungen wiederum zu Veränderungen der Absorptionsbanden. Abhängig von den Kopplungselementen schieben diese zu höheren oder niedrigeren Wellenzahlen und es kommt in der Regel zu Veränderungen der Bandenform und Intensität.

Diese Prozesse finden ebenso nach dem Übergang in den Grundzustand statt, unabhängig davon, ob eine photochemische Reaktion abgelaufen ist oder wieder das ursprüngliche Molekül vorliegt. Da die Schwingungsenergieumverteilung nach der elektronischen Deaktivierung auf der Zeitskala von Pikosekunden stattfindet, wird sehr schnell wieder eine thermische Besetzung der Energieniveaus bei starker Erhöhung der molekularen Temperatur erreicht. In der Folge kommt es durch die Kopplung mit Lösungsmittelmoden zur Abkühlung des Moleküls und somit einer Angleichung mit der Umgebungstemperatur. Typischerweise erfolgt dieser Kühlprozess auf der Zeitskala von einigen zehn Pikosekunden

⁶engl.: Intersystem Crossing, ISC

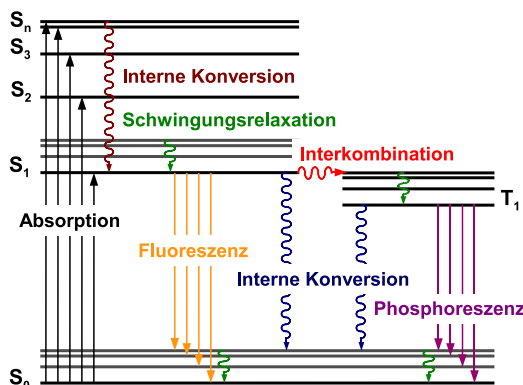


Abbildung 2.1: Jablonski Diagramm: Schematische Übersicht der molekularen Energieniveaus und der nach Photoanregung im UV/vis-Bereich ablaufenden molekularen Prozesse. Die Zeichnung wurde freundlicherweise von M.-K. Verhoeven zur Verfügung gestellt und modifiziert.

[62, 63]. Insofern sind in den transienten Infrarotspektren auch Absorptionsdifferenzen einzubeziehen, die allein auf der Temperaturerhöhung der Lösungsumgebung beruhen.

Schließlich wird die Wärmeenergie innerhalb der Probenzelle durch Konvektion und Wärmeleitung wieder an die Umgebung abgegeben. Diese Prozesse sind deutlich langsamer und finden im Zeitbereich von Millisekunden statt, sie brauchen in den hier aufgenommenen transienten Infrarotspektren nicht beachtet werden.

2.5 Anreg-/Abtast-Spektroskopie

Chemische und biologische Reaktionen treten in vielfältiger Weise in der Natur und Alltagserfahrung auf. Ihre Beobachtung beschränkt sich dabei meist auf die vergleichsweise langsame Verlagerung chemischer Gleichgewichte, wie das Aushärten von Cyanacrylat (Sekundenkleber), die Denaturierung von Eiweiß beim Kochen von Eiern, die Verfärbung abgefallener Blätter oder die Bildung von Grünspan auf Dachrinnen aus Kupfer. Während der makroskopische Reaktionsfortschritt bei diesen Beispielen im Zeitbereich von Sekunden bis Jahren liegt, laufen die damit verbundenen mikroskopischen, also molekularen, Prozesse wesentlich schneller ab.

Die elementaren Prozesse bei chemischen Reaktionen sind die Bildung oder das Lösen molekularer Bindungen oder Änderungen der räumlichen Struktur eines Moleküls. Die Zeitskala auf der diese ablaufen wird folglich durch die damit verbundenen Kernbewegungen bestimmt und liegt im Bereich der Periodendauer molekularer Schwingungen im Bereich von einigen Femtosekunden bis Pikosekunden. Für die Untersuchung des Reaktionsverlaufes benötigt man eine Messtechnik mit entsprechend hoher Zeitauflösung. Die Echtzeitaufzeichnung elektronischer Messsignale ist dafür ungeeignet, da selbst schnellste Oszilloskope mit 1 GHz Bandbreite nur Signaländerungen im Nanosekundenbereich verfolgen können und Induktivitäten und Kapazitäten in der Messkette die

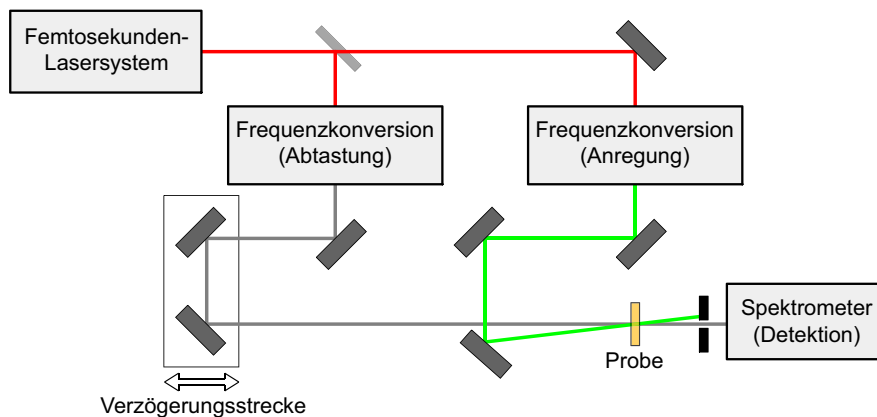


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines Anreg-/Abtastexperimentes.

Signalverläufe zusätzlich verfälschen. Zudem stellt sich die Frage, wie man eine Reaktion zum richtigen Zeitpunkt startet bzw. das Messgerät mit der Probe synchronisiert. Beide Probleme lassen sich sehr elegant mit der Anreg-/Abtasttechnik⁷ lösen. Abbildung 2.2 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Anreg-/Abtastexperimentes. Ein sehr kurzer Laserpuls wird in zwei Teile gespalten, von denen einer die Probe anregt, also die Reaktion startet, und der zweite die Veränderung einer optisch messbaren Größe wie z. B. der Absorption zu einem genau definierten Zeitpunkt abtastet. Im Allgemeinen ist das Spektrum des Lasers für die Anregung und/oder Abtastung nicht geeignet. Unter Ausnutzung verschiedener nichtlinearer optischer Prozesse kann die Frequenz des Lichtes in weiten Bereichen angepasst werden. Bei dieser Frequenzkonversion lassen sich sowohl spektral breitbandige Pulse erzeugen, die z. B. die simultane Abtastung in ihrem Spektralbereich ermöglichen oder hochintensive schmalbandige Pulse z. B. zur gezielten Anregung eines bestimmten elektronischen Übergangs.

Anreg- und Abtastpuls sind über ihre optischen Wege miteinander synchronisiert und mit Hilfe einer optischen Umwegstrecke in einem der Strahlengänge kann eine beliebige Zeitverzögerung eingestellt werden. Die Messung der Zeitdifferenz wird so in eine Weglängenmessung überführt und es lassen sich leicht Auflösungen im sub- μm -Bereich erreichen, was Zeitverzögerungen von etwa 3 fs entspricht. In diesem Fall ist die Zeitauflösung des Experimentes prinzipiell nur noch durch die Pulsdauern des verwendeten Lasersystems bestimmt, diese liegt typischerweise im Bereich von etwa 10 fs bis zu einigen 100 fs. Um die komplette Zeitantwort des untersuchten Systems auf den Anregungspuls zu erhalten wird nun die Messung mit unterschiedlichen Verzögerungszeiten wiederholt.

2.5.1 Transiente Absorptionsspektroskopie im mittleren Infraroten

Der konzipierte Aufbau dient der Absorptionsspektroskopie im mittelinfraroten Spektralbereich mit einer Zeitauflösung von etwa 0,3 ps. Ziel ist die Aufzeichnung der lichtinduzierten

⁷engl.: pump/probe

Absorptionsänderung der Probe $\Delta A(\tilde{\nu}, t)$, die sich bei der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ zur Zeit t nach der Anregung ergibt. Für das Absorptionsspektrum der angeregten ($A^*(\tilde{\nu}, t)$) und der nicht-angeregten Probe ($A(\tilde{\nu})$) gilt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$A(\tilde{\nu}) = -\log_{10} \left(\frac{I(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})} \right) \quad \text{bzw.} \quad A^*(\tilde{\nu}, t) = -\log_{10} \left(\frac{I^*(\tilde{\nu}, t)}{I_0^*(\tilde{\nu}, t)} \right) \quad (2.6)$$

mit den jeweils detektierten Intensitäten des Lichtbündels $I_0^*(\tilde{\nu}, t)$ bzw. $I_0(\tilde{\nu})$ vor der Probe und $I^*(\tilde{\nu}, t)$ bzw. $I(\tilde{\nu})$ nach der Probe. Damit erhält man für die lichtinduzierte Absorptionsdifferenz:

$$\Delta A(\tilde{\nu}, t) = A^*(\tilde{\nu}, t) - A(\tilde{\nu}) \quad (2.7)$$

$$= -\log_{10} \left(\frac{I^*(\tilde{\nu}, t)}{I_0^*(\tilde{\nu}, t)} \right) + \log_{10} \left(\frac{I(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})} \right) \quad (2.8)$$

$$= -\log_{10} \left(\frac{I^*(\tilde{\nu}, t) I_0(\tilde{\nu})}{I_0^*(\tilde{\nu}, t) I(\tilde{\nu})} \right) \quad (2.9)$$

$$= -\log_{10} \left(\frac{I^*(\tilde{\nu}, t)}{I(\tilde{\nu})} \right) \quad \text{mit } I_0^*(\tilde{\nu}, t) = I_0(\tilde{\nu}) \quad (2.10)$$

Gleichung 2.10 zeigt, dass eine Referenzmessung zur Bestimmung $I_0^*(\tilde{\nu}, t)$ und $I_0(\tilde{\nu})$ nicht notwendig ist, um die lichtinduzierte Absorptionsdifferenz zu messen – solange die Spektren der Abtastpulse vor der Probe für beide Messungen identisch sind.

In der Praxis lassen sich die Pulsspektren jedoch nicht exakt reproduzieren, so dass erst die Mittelwertbildung über viele Einzelmessungen die erforderliche Auflösung liefert. Dabei wird durch ein Unterbrecherrad jeder zweite Anregungspuls abgeblockt, so dass $I^*(\tilde{\nu}, t)$ und $I(\tilde{\nu})$ mit zwei aufeinanderfolgenden Abtastpulsen gemessen werden. Dies kann zu Problemen führen, falls das untersuchte System nur langsam relaxiert oder gar eine irreversible Reaktion auftritt. Hier ist ein kontinuierlicher Austausch der Probe in der Messzelle erforderlich, so dass jede Einzelmessung nur an relaxierten bzw. nicht angeregten Proben durchgeführt wird. Auf die Details der Datenauswertung wird bei der Beschreibung des Messprogramms in Abschnitt 3.2 ab S. 51 genauer eingegangen.

2.5.2 Erzeugung ultrakurzer Laserpulse

Die Erzeugung immer kürzerer Laserpulse begann direkt nach der ersten Realisierung eines Lasers [64] und ist heute in verschiedenen Übersichtsartikeln und Lehrbüchern detailliert beschrieben [65–69]. Hier werden deshalb nur einige wichtige Begriffe erläutert.

Nach der Heisenbergschen Unschärferelation ist die Bandbreite eines Pulses mit der Pulsdauer verknüpft:

$$\Delta\omega\Delta t \geq \frac{h}{2\pi} \quad (2.11)$$

Das optische Spektrum eines Laserpulses der Dauer Δt muss also mindestens die Bandbreite $\Delta\omega$ besitzen. Dementsprechend kommen prinzipiell nur solche Laser in Frage, die eine ausreichende Verstärkungsbandbreite besitzen.

Ein Laserresonator erzeugt jedoch stets ein Spektrum diskreter Frequenzen bzw. Wellenlängen, welche die Bedingung für stehenden Wellen zwischen den Resonatorspiegeln erfüllen. Das Auftreten eines im Resonator umlaufenden Laserpulses entspricht der konstruktiven Interferenz vieler dieser sogenannten Longitudinalmoden. Im Fall eines umlaufenden Pulses weisen alle diese Wellen eine feste Phasenbeziehung auf, man spricht von der Kopplung der Resonatormoden. Um sehr kurze Pulsdauern von unter 1 ns zu erreichen benötigt man die Verstärkung aller Moden in einem breiten Spektralbereich und ihre phasenrichtige Überlagerung. Im wesentlichen unterscheidet man zwei Techniken: die aktive und die passive Modenkopplung.

Bei der aktiven Modenkopplung werden die optischen Eigenschaften eines im Laserresonator integrierten Bauteils durch ein externes Signal moduliert. Entspricht die Modulationsperiode genau der Umlaufzeit der Wellen im Resonator, dann lassen sich so alle auftretenden Wellen miteinander koppeln. Die kürzesten erreichbaren Pulsdauern sind durch die Umlaufzeit und die Modulationsfrequenz beschränkt und liegen bei etwa 10 ps.

Bei der passiven Modenkopplung werden die optischen Eigenschaften eines nichtlinearen Materials im Laserresonator durch die Laserstrahlung selbst moduliert. Es sind keine externen Signale erforderlich und die Modulation ist automatisch mit den Umläufen im Resonator synchronisiert. Im Grunde basieren alle diese Techniken darauf, dass kürzere Pulse mit höheren Intensitäten geringere Verluste und damit eine höhere Nettoverstärkung erfahren. Bei geschickter Auslegung bleibt nach genügend Umläufen nur ein einziger Puls im Resonator übrig, alle anderen Signale werden unterdrückt und liegen somit unterhalb der Laserschwelle. Dabei werden verschiedene optische Eigenschaften genutzt um intensitätsabhängige Verluste einzuführen: sättigbare Absorber, die Intensitätsabhängigkeit des Brechungsindex (Kerr-Effekt) oder die hier verwendete nichtlineare Polarisationsrotation.

Die erreichbaren Pulsenergien sind durch die Zerstörschwellen der Materialien im Resonator beschränkt, so dass sich nur relativ schwache Pulse auskoppeln lassen. Um dieses Problem zu beheben, können die Pulse in Anordnungen aus Gittern oder Prismen zeitlich gestreckt werden. Die gestreckten Pulse mit geringerer Spitzenintensität werden dann in einen weiteren Laserresonator eingekoppelt, verstärkt und anschließend wieder komprimiert. Man bezeichnet diese Technik als *Chirped Pulse Amplification* und die Lasersysteme kurz als *CPA* [70], da die künstlich eingeführte Dispersion zu einer wellenlängenabhängigen Phasenverschiebung, einem sogenannten Chirp⁸ führt. Dieser Einfluss der Dispersion wird in Abschnitt 2.5.5 ab S. 23 näher erläutert.

2.5.3 Nichtlineare Optik

Je nach verwendetem Kurzpulslasersystem lassen sich die Zentralwellenlängen der emittierten Pulse nur um einige 10 nm oder wie beim hier verwendeten System gar nicht variieren. Um die Substanzen anzuregen und die lichtinduzierten Reaktionen danach im

⁸engl.: to chirp – zwitschern

gewünschten Spektralbereich untersuchen zu können, sind also weitere Prozesse notwendig, die zu einer Wellenlängenkonversion führen. Hierzu bedient man sich der nichtlinearen Optik, deren wesentliche Grundzüge im Folgenden kurz dargestellt werden. Weiterführende Informationen finden sich beispielsweise in entsprechenden Lehrbüchern [66–69, 71]. Außerdem sei noch auf das kostenlos erhältliche Programm *SNLO* hingewiesen, das die komfortable Berechnung und Optimierung verschiedenster nichtlinearer Prozesse für eine große Anzahl von Kristallen erlaubt [72].

Optische Frequenzkonversion

Aus der Alltagserfahrung ist das Superpositionsprinzip des Lichtes bekannt, nach dem zwei elektromagnetische Wellen, die sich in einem transparenten Medium überlagern, nicht miteinander wechselwirken und nur ihre Summe als Interferenzmuster beobachtet wird. Ursache für diese Beobachtung ist, dass das elektrische Feld des Lichtes nur zu einer geringen Auslenkung der Elektronen führt, in diesem Fall kann deren Potential näherungsweise als harmonisch betrachtet werden. Die durch die Ladungsverschiebung in Atomen und Molekülen induzierten Dipolmomente $\vec{p}(\vec{E})$ ergeben die makroskopische dielektrische Polarisation $\vec{P}(\vec{E}) = \sum \vec{p}(\vec{E})$. Diese ist proportional zur Feldstärke $\vec{E}(t)$ und dem linearen Suszeptibilitätstensor $\chi^{(1)}$, man befindet sich im Gültigkeitsbereich der linearen Optik:

$$\vec{P} \approx \epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E} \quad (2.12)$$

Bei sehr hohen elektrischen Feldstärken ist die harmonische Näherung unzureichend, es sind zusätzliche Terme höherer Ordnung zu berücksichtigen. Unter Vernachlässigung der Abhängigkeit der Polarisation von der magnetischen Flussdichte \vec{B} sowie der magnetischen Suszeptibilität ($\mu_r = 1$) ergibt sich jedoch auch hier die dielektrische Polarisation pro Volumeneinheit als $\vec{P}(\vec{E}) = \sum \vec{p}(\vec{E})$ und man kann eine Reihenentwicklung durchführen:

$$\vec{P}(\vec{E}) = \epsilon_0 \left(\chi^{(1)} \vec{E} + \left(\chi^{(2)} \vec{E} \right) \vec{E} + \dots \right) \quad (2.13)$$

Die Suszeptibilität n ter Ordnung $\chi^{(n)}$ ist dabei ein Tensor der Stufe $n+1$. Die Werte sind von der Größenordnung: $\chi^{(1)} \approx 1$, $\chi^{(2)} \approx 10^{-10} \frac{\text{cm}}{\text{V}}$, $\chi^{(3)} \approx 10^{-17} \frac{\text{cm}^2}{\text{V}^2}$. An diesen Zahlen erkennt man, warum die Terme höherer Ordnung zwar bei extrem hohen Feldstärken, wie sie beispielsweise bei kurzen Laserpulsen auftreten, eine Rolle spielen, jedoch im Alltag nie beobachtet werden.

Betrachtet man nun die Überlagerung zweier ebener elektromagnetischer Wellen mit den Frequenzen ω_1 und ω_2 , die sich in \vec{z} -Richtung ausbreiten:

$$\vec{E} = \vec{E}_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \cdot \vec{z}) + \vec{E}_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \cdot \vec{z}) \quad (2.14)$$

Dann erhält man für die induzierte Polarisation in einem isotropen dielektrischen Medium nach Gl. (2.13):

$$\begin{aligned} \vec{P}(\omega) = & \epsilon_0 \chi^{(1)} \left[\vec{E}_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + \vec{E}_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[\vec{E}_1^2 \cos^2(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + \vec{E}_2^2 \cos^2(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right. \\ & \left. + 2\vec{E}_1 \vec{E}_2 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] + \dots \end{aligned} \quad (2.15)$$

Mit $\cos^2(\alpha) = \frac{1}{2}(1 + \cos(2\alpha))$ und $\cos(\alpha) + \cos(\beta) = \frac{1}{2}[\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)]$ ergeben sich für die nichtlineare Polarisation 2. Ordnung folgende Terme:

$$\begin{aligned} P^{(2)}(\omega) = & \epsilon_0 \chi^{(2)} E_1^2 E_2^2 \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[E_1^2 \cos(2\omega_1 t + 2\vec{k}_1 \vec{z}) + E_2^2 \cos(2\omega_2 t + 2\vec{k}_2 \vec{z}) \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[E_1 E_2 \cos\left((\omega_1 + \omega_2)t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2)\vec{z}\right) \right] \\ & + \epsilon_0 \chi^{(2)} \left[E_1 E_2 \cos\left((\omega_1 - \omega_2)t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2)\vec{z}\right) \right] \end{aligned} \quad (2.16)$$

Beide Wellen wechselwirken also miteinander, die von ihnen induzierte Polarisation führt zur Erzeugung neuer Frequenzen. Bei geeigneter experimenteller Auslegung können bestimmte Prozesse sehr effizient ablaufen. Die Prozesse bezeichnet man dann nach den entstehenden Frequenzen: den frequenzunabhängigen Term $E_1^2 E_2^2$ als optische Gleichrichtung, die Terme mit $2\omega_1$ und $2\omega_2$ als Frequenzverdopplung (SHG⁹), den Term $\omega_1 + \omega_2$ als Summenfrequenz- (SFG¹⁰) und $\omega_1 - \omega_2$ als Differenzfrequenzerzeugung (DFG¹¹). Da es sich um die Wechselwirkung von drei elektromagnetischen Wellen handelt, spricht man von Dreiwellenmischprozessen.

Die induzierte Polarisation \vec{P} hängt dabei sowohl von der Polarisation der einfallenden Wellen (E_x, E_y, E_z), als auch von den Eigenschaften und der Symmetrie des Mediums ab, also von den Komponenten des Suszeptibilitätstensors. Dies lässt sich gut nachvollziehen, wenn man Gleichung (2.13) komponentenweise ausschreibt:

$$P_i = \epsilon_0 \left(\sum_{k=1}^3 \chi_{ik}^{(1)} E_k + \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^3 \chi_{ijk}^{(2)} E_j E_k + \dots \right) \quad (2.17)$$

Neben ausreichender Lichtintensität ist die Auswahl eines geeigneten nichtlinearen Mediums und die Anpassung der Polarisation der einlaufenden Strahlen besonders wichtig, um einen der genannten Prozesse zu ermöglichen.

⁹engl.: Second Harmonic Generation

¹⁰engl.: Sum Frequency Generation

¹¹engl.: Difference Frequency Generation

Für die Dreiwellenmischprozesse gilt darüberhinaus die Energie- und Impulserhaltung, mit $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ und $\vec{p} = \hbar\vec{k}$ ergibt sich:

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2 + \Delta E \quad (2.18)$$

$$\hbar\vec{k}_3 = \hbar\vec{k}_1 + \hbar\vec{k}_2 + \Delta\vec{k} \quad (2.19)$$

Sowohl für die beteiligten Lichtwellen als auch für die induzierte Polarisation im dielektrischen Medium kann – bei den hier betrachteten Pulsdauern im Bereich von mehreren zehn Femtosekunden – angenommen werden, dass sich die Amplituden im Vergleich zur Schwingungsperiode des Lichtes ($\tau \approx 10^{-15}\text{s}$) nur langsam ändern. Somit kann die Gültigkeit der SVEA¹² angenommen werden und es gilt: $\Delta E = 0$. Das entspricht der Vorstellung, dass zwei niederenergetische Photonen der Energie $\hbar\omega_1$ und $\hbar\omega_2$ zu einem Photon höherer Energie $\hbar\omega_3$ verschmolzen werden bzw. umgekehrt, dass ein hochenergetisches Photon in zwei niederenergetische aufgespalten wird. Der Fehlerterm $\hbar\Delta\vec{k}$ lässt sich als Impulsunschärfe im Sinne der Orts-Impuls-Unschärferelation ($\Delta x \cdot \Delta p \geq \hbar/2$) auffassen. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen werden im nächsten Abschnitt genauer erläutert.

Analog zu den hier dargelegten Betrachtungen lassen sich auch die mit der Suszeptibilität dritter Ordnung $\chi^{(3)}$ verbundenen Prozesse motivieren. Es handelt sich unter anderem um die Frequenzverdreifung, die Vierwellenmischung, die Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation, die induzierte Rayleigh- und Ramanstreuung und die Zwei-Photonen-Absorption. Auf eine Darstellung der Prozesse dritter und höherer Ordnung wird verzichtet. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Weißlichterzeugung (Abschnitt 2.5.4) im Wesentlichen auf optisch nichtlinearen Effekten dritter Ordnung basiert.

Phasenanpassung in optisch anisotropen Kristallen

In der Motivation der Frequenzkonversion durch optisch nichtlineare Prozesse wurden unendlich ausgedehnte Wellen verwendet und danach gilt z. B. für die Summenfrequenzzeugung:

$$\hbar\vec{k}_3 = \hbar\vec{k}_1 + \hbar\vec{k}_2 \quad (2.20)$$

Das Verschwinden der Phasenfehlanpassung $\Delta\vec{k}$ aus Gleichung 2.19 entspricht der konstruktiven Überlagerung der an verschiedenen Orten \vec{z} und $\vec{z} + \Delta\vec{z}$ erzeugten Wellen. Mit der frequenzabhängigen Brechzahl $n(\omega)$ und der Lichtgeschwindigkeit c erhält man den Wellenvektor für die Ausbreitung in \vec{z} -Richtung:

$$\vec{k} = \frac{n(\omega)}{c} \vec{e}_z \quad (2.21)$$

¹²engl.: Slowly Varying Envelope Approximation

Zusammen mit der Impulserhaltung aus Gl. (2.19) ergibt sich für die Beträge:

$$\frac{n(\omega_3)\omega_3}{c} = \frac{n(\omega_1)\omega_1}{c} + \frac{n(\omega_2)\omega_2}{c} + \Delta k \quad (2.22)$$

mit $\Delta k = 0$ folgt:

$$n(\omega_3)\omega_3 = n(\omega_1)\omega_1 + n(\omega_2)\omega_2 \quad (2.23)$$

Diese Bedingung kann in isotropen Medien im Allgemeinen nicht erfüllt werden, denn für Spektralbereiche ohne Absorptionslinien liegt normale Dispersion vor und es gilt:

$$\omega_3 > \omega_2 \geq \omega_1 \quad \Rightarrow \quad n(\omega_3) > n(\omega_2) \geq n(\omega_1) \quad (2.24)$$

In diesem Fall könnten nur sehr dünne Medien eingesetzt werden, so dass der optische Weg im Material kürzer als die Kohärenzlänge der am Mischprozess beteiligten Wellen ist, also der Länge, nach der es zur Auslöschung der an verschiedenen Orten erzeugten Wellen kommt. Im Sinne von Gleichung 2.19 bedeutet ein dünner Kristall, dass der Ort der Frequenzkonversion sehr genau bekannt ist ($\Delta x \rightarrow 0$) und daher der Impuls der erzeugten Welle eine größere Unschärfe erfährt. So kann jedoch nur eine sehr schwache Konversion erreicht werden: da die Konversionseffizienz quadratisch mit der Weglänge im Kristall anwächst, ist für eine effiziente Konversion die Verwendung wesentlich dickerer Kristalle notwendig.

Einen Ausweg bieten optisch anisotrope Medien: wegen der Doppelbrechung kann für unterschiedlich polarisierte Strahlung eine Anpassung der Brechungsindizes und damit der Phasengeschwindigkeiten erreicht werden. Man unterscheidet generell optisch uniaxiale Kristalle, die durch zwei ($n_x = n_y \neq n_z$) und optisch biaxiale Kristalle, die durch drei verschiedene Brechungsindizes (n_x, n_y, n_z) charakterisiert sind. Weiterhin werden nur die besonders wichtigen, uniaxialen Kristalle betrachtet. Diese besitzen eine Symmetrieachse, die optische Achse. Ist ein Strahl senkrecht zur optischen Achse polarisiert, dann bezeichnet man ihn als den ordentlichen Strahl, er erfährt einen Brechungsindex n_o (*ordinary*) und folgt dem Brechungsgesetz nach *Snellius*.

Ein Strahl, dessen Polarisation in der Ebene aus seiner Ausbreitungsrichtung und der optischen Achse liegt wird als außerordentlich bezeichnet. Er folgt nicht dem *Snellius-Gesetz*, denn sein Brechungsindex $n(\theta)$ hängt von Winkel θ zwischen optischer Achse und Ausbreitungsrichtung ab und bildet das sogenannte Indexellipsoid mit n_e (*extraordinary*):

$$\frac{1}{n^2(\theta)} = \frac{\cos^2(\theta)}{n_o^2} + \frac{\sin^2(\theta)}{n_e^2} \quad (2.25)$$

$$n(\theta) = \frac{n_o n_e}{\sqrt{n_e^2 \cos^2(\theta) + n_o^2 \sin^2(\theta)}} \quad (2.26)$$

Einfallendes Licht wird entsprechend seiner Polarisation ggf. in einen ordentlichen und einen außerordentlichen Anteil aufgespalten. Offensichtlich verschwindet diese Doppelbrechung für Transmission entlang der optischen Achse. Wegen der verschiedenen

	Typ I			Typ II		
	ω_1	ω_2	ω_3	ω_1	ω_2	ω_3
negativ uniaxial	<i>o</i>	<i>o</i>	<i>e</i>	<i>o</i>	<i>e</i>	<i>e</i>
positiv uniaxial	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>o</i>	<i>e</i>	<i>o</i>	<i>e</i>

Tabelle 2.1: Mögliche Anordnung für die Phasenanpassung in negativ und positiv uniaxialen Kristallen für einen Dreiwellenmischprozess mit $\omega_1 + \omega_2 = \omega_3$ und $\omega_3 \geq \omega_2 > \omega_1$ nach [73]. Angegeben ist die Polarisation der Wellen, also ob sie als ordentlicher (*o*) oder außerordentlicher Strahl (*e*) propagieren.

Brechungsindizes des ordentlichen (n_o) und des außerordentlichen ($n(\theta)$) Strahls ist eine Phasenanpassung durch geeignete Wahl des Winkels θ möglich.

Für die uniaxialen Kristalle wurden bereits 1965 von Midwinter und Warner die Bedingungen für Phasenanpassung formuliert [73]. Generell wird zwischen Typ I- und Typ II-Phasenanpassung unterschieden: Bei Typ I-Phasenanpassung sind die beiden niederfrequenten Wellen (ω_1 und ω_2) parallel zueinander polarisiert, bei Typ II senkrecht. Die Art des Kristalls bestimmt, welche der am Mischprozess beteiligten Wellen als ordentliche und welche als außerordentliche Strahlen propagieren. Man unterscheidet negativ uniaxiale Kristalle ($n_e < n_o$) und positiv uniaxiale Kristalle ($n_e > n_o$), die möglichen Konfigurationen für die Phasenanpassung sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die in dieser Arbeit verwendeten Kristalle aus β -Bariumborat (BBO) und Silberthiogallat (AgGaS_2) sind negativ uniaxial, der Kristall aus Kaliumtitanylphosphat (KTP) ist positiv biaxial.

Neben der Phasenanpassung in doppelbrechenden Materialien kann *Quasi-Phasenanpassung* in sogenannten periodisch gepolten Kristallen erreicht werden, was in jüngster Zeit sehr erfolgreich eingesetzt wird [74, 75]. In diesen Kristallen wechseln sich Bereiche mit unterschiedlicher Orientierung der ferroelektrischen Domänen ab und sorgen so für einen Phasensprung in der Kopplung der am Mischprozess beteiligten Wellen innerhalb der Kohärenzlänge. Einer der bekanntesten Vertreter dieser Klasse ist der *PPLN*-Kristall¹³.

Optisch Parametrische Verstärkung

Nichtlineare optische Effekte zweiter Ordnung erlauben die Erzeugung von Licht mit durchstimmbarer Wellenlänge, was man als parametrische Konversion bezeichnet. Im Photonenbild entspricht dieser Prozess der Aufspaltung eines hochenergetischen Photons $\hbar\omega_p$ (*Pump photon*) in zwei mit niedrigerer Energie $\hbar\omega_s$ (*Signal photon*) und $\hbar\omega_i$ (*Idler photon*) gemäß $\hbar\omega_p = \hbar\omega_s + \hbar\omega_i$. Aufgrund der Energieerhaltung entsteht für jedes vernichtete hochenergetische Photon ein Paar niederenergetischer. Die interessierende Welle wird allgemein als Signal und die zusätzliche als Leerlaufwelle (*Idler*¹⁴) bezeichnet. Der zugrundeliegende Prozess ist die in Gleichung (2.16) gezeigte Differenzfrequenzerzeugung: $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$, mit $\omega_s = \omega_3$, $\omega_p = \omega_1$, $\omega_i = \omega_2$.

¹³engl.: Periodically Poled LithiumNiobate (LiNiO_3)

¹⁴engl.: Faulenzer

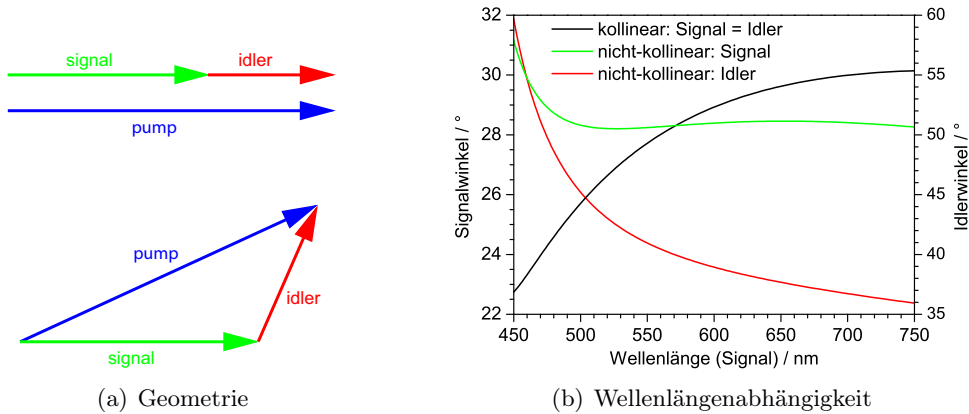


Abbildung 2.3: Phasenanpassung mit kollinear und nicht-kollinear Anordnung am Beispiel der parametrischen Konversion ($\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_i$). Durch den eingeführten Winkel zwischen Pump- und Signalstrahl (Pump-Tilt) laufen auch Signal und Idler nicht mehr in derselben Richtung. In (b) sind die Phasenanpassungswinkel für Signal und Idler für Typ I-Phasenanpassung in BBO für eine Pumpwellenlänge von 388 nm in Abhängigkeit von der Signalwellenlänge gezeigt. Die Berechnungen wurden mit dem Programm SNLO[72] durchgeführt, es wurde ein Nichtkollinearitätswinkel von $3,7^\circ$ angenommen.

Wird nur eine intensive Pumpwelle in den nichtlinearen Kristall eingestrahlt, dann kommt es zur Verstärkung von Quantenrauschen, der sogenannten parametrischen Fluoreszenz. Dabei entstehen alle möglichen Paare von Signal und Idler, für die eine ausreichende nichtlineare Kopplung und Phasenanpassung vorliegen. Wird gleichzeitig mit dem Pumplicht eine schwache Signalwelle (*engl.*: *seed*) in den Kristall eingekoppelt, dann wird diese im Kristall exponentiell auf Kosten der Pumpwelle verstärkt und zusätzlich entsteht eine ebenfalls exponentiell anwachsende Idlerwelle. Die Ausbreitungsrichtungen von Pump-, Signal- und Idlerwelle im Kristall sind durch die Phasenanpassungsbedingung (Impulserhaltung) vorgegeben. Man spricht von parametrischer Verstärkung bzw. in Bezug auf den Aufbau von einem optisch parametrischen Verstärker [76] (*OPA*¹⁵).

Neben der bisher diskutierten kollinearen Anordnung aller Strahlen kann die Verstärkung ebenfalls in einer nichtkollinearen Geometrie erfolgen (*NOPA*¹⁶). Dafür werden der Pump- und der Seedstrahl unter einem Winkel in den Kristall eingekoppelt. Da es sich bei den Impulsen der Photonen um vektorielle Größen handelt (vgl. Gl. 2.19), steht ein zusätzlicher Freiheitsgrad zur Verfügung: der Winkel zwischen Signal und Idler.

Bei geeigneter Geometrie erreicht man die simultane Phasenanpassung und damit Verstärkung für einen großen Frequenzbereich des Signals mit demselben Phasenanpassungswinkel. Außerdem wird bei dieser Anordnung eine Pulsverlängerung infolge der unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten von Signal- und Idlerwelle vermieden, da die Projektion der Gruppengeschwindigkeit des Idlerpulses auf die Richtung des Signals gleich der Gruppengeschwindigkeit des Signalpulses ist.

¹⁵engl.: Optical Parametric Amplifier

¹⁶engl.: Non collinear Optical Parametric Amplifier

Abbildung 2.3 zeigt die schematische Anordnung und eine Berechnung der Phasenanpassungswinkel von Signal- und Idlerwelle für die in dieser Arbeit verwendeten Parameter: Mit einem BBO-Kristall lässt sich bei einer Pumpwellenlänge von 388 nm parametrische Verstärkung (Typ I) im gesamten Bereich von 500 nm bis 750 nm erreichen, wenn der Winkel zwischen Pump- und Signalstrahl $3,7^\circ$ beträgt. Die Phasenanpassung ist dann für alle Signalwellenlängen unter demselben Winkel von $28,5^\circ$ zur optischen Achse erfüllt, während der Winkel für den Idler zwischen 35° und 65° variiert (Abb. 2.3(b)).

Zahlreiche Artikel beschäftigen sich mit der Theorie sowie der Optimierung von OPA- und NOPA-Systemen [77–85], auf eine ausführliche Darstellung kann hier folglich verzichtet werden.

2.5.4 Weißlichterzeugung

Schon 1969 entdeckten Alfano und Shapiro, dass ein kurzer, hochintensiver Laserpuls durch Fokussierung in ein transparentes Medium eine beachtliche spektrale Verbreiterung erfahren kann [86, 87]. Dieser Prozess wird Weißlicht- oder Superkontinuumerzeugung genannt und ist seit über vierzig Jahren Gegenstand der Forschung, so dass sich heute umfangreiche Bücher allein mit den Aspekten der Weißlichterzeugung und ihrer Anwendungen beschäftigen [88]. Die zugrundeliegenden Prozesse sind extrem komplex: die hohe elektrische Feldstärke des propagierenden ultrakurzen Laserpulses verzerrt die gegebene Ladungsverteilung, was zu einem veränderten Brechungsindex des Materials führt und wiederum die Phase, Amplitude und Frequenz der Welle beeinflusst (Selbstphasenmodulation). Der intensitätsabhängige Brechungsindex n_2 führt zu einer Selbstfokussierung des Strahls, was eine Reihe weiterer nichtlinearer Prozesse verursacht. Diese wirken der Fokussierung teilweise entgegen, so beispielsweise die Mehrphotonenanregung. Für Festkörper wurde außerdem gezeigt, dass es oberhalb einer kritischen Intensität in Folge der nichtlinearen Dispersion zu einem ausgeprägten positiven Chirp und einer Aufsteilung der abfallenden Pulsflanke kommt, welche für die extreme spektrale Verbreiterung verantwortlich ist [89–92]. Halten sich fokussierende und defokussierende Effekte gerade die Waage, dann bilden sich sogenannte Filamente aus, also Bereiche, in denen das Lichtbündel mit einem konstanten Durchmesser von etwa $100\ \mu\text{m}$ im Material propagiert. Die Ausbildung von Filamenten erhöht die Strecke der nichtlinearen Wechselwirkung, entsprechend steigt die Effizienz der Weißlichterzeugung.

Filamente und Weißlichterzeugung wurden in Festkörpern, Flüssigkeiten und Gasen beobachtet und untersucht [93–99], entsprechend ergibt sich eine Vielzahl interessanter Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise lassen sich mit den heute verfügbaren Lasersystemen mit Pulsleistungen im Terawattbereich Filamente von über 20 km Länge generieren, die eine breitbandige Spektroskopie der Atmosphäre bis in große Höhen erlauben [100–102]. Für die Anwendung des Weißlichtkontinuums als Seedstrahl der parametrischen Verstärker kommen allerdings nur Festkörper in Frage, da sie für die langzeitstabile Erzeugung rauscharmer, unstrukturierter Spektren mit geringen Energiefluktuationen am besten geeignet sind.

Das Spektrum und die Intensität des erzeugten Kontinuums hängt von vielen Parametern ab. Während die Bandlücke des verwendeten Materials [103] oder die Polarisation des Lasers bzw. die Ausrichtung optisch anisotroper Materialien [104] vor dem Experiment festliegen, lassen sich die numerische Apertur des Fokus und die Energie der Laserpulse durch variable Abschwächer und Irisblenden bei der Justage einstellen. Optimal ist die Erzeugung eines einzelnen Filamentes, was zu reproduzierbaren breitbandigen und kohärenten Pulsen führt [105]. Diese eignen sich gut für den Einsatz in parametrischen Verstärkern [76], selbst die Verstärkung modifizierter Weißlichtpulse ist möglich [106].

Für die hier vorgestellten Experimente wurden ausschließlich Saphirfenster unterschiedlicher Dicken zur Kontinuumerzeugung eingesetzt, da sie eine extrem hohe Zerstörungsschwelle besitzen und über Monate in der Anlage verbleiben können. Die im Saphir generierten Weißlichtspektren sind hinsichtlich ihrer Breite und Intensität vollkommen ausreichend.

Moderne strukturierte Materialien wie photonische Kristalle oder Hohlfasern sind nur für geringe Pulsenergien geeignet, erzeugen strukturierte Spektren und sind hinsichtlich der Einkopplung des Lichtes sehr kritisch und werden wohl in naher Zukunft keine Rolle in diesen Anwendungen spielen. Im Gegensatz dazu zeigen aktuelle Untersuchungen zur Weißlichterzeugung in typischen Lasermaterialien, dass diese dem Saphir zumindest in Hinblick auf den nahen Infrarotbereich teilweise überlegen sind [107].

2.5.5 Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Alle transparenten Materialien zeigen im Bereich des sichtbaren Lichtes eine normale Dispersion, also einen wellenlängenabhängigen Brechungsindex:

$$\frac{dn}{d\lambda} < 0 \quad (2.27)$$

Deshalb ist auch die Gruppengeschwindigkeit des Lichtes in diesen Materialien wellenlängenabhängig. Wie bereits in Abschnitt 2.5.2 dargestellt wurde, sind sehr kurze Laserpulse nicht als monochromatisch zu betrachten und deshalb ist ihre Dispersion bei Propagation durch ein Medium nicht zu vernachlässigen. Es kommt zu einem Auseinanderlaufen der Spektralkomponenten, die langwelligen Anteile laufen den kurzwelligen voraus, die Pulsdauer verlängert sich. Man bezeichnet diesen Effekt als *Chirp*. Im Falle normaler Dispersion spricht man von einem positiven (normalen), bei negativer Dispersion von negativem (anormalen) Chirp. Beide Fälle werden in Abbildung 2.4 zusammen mit einem ungechirpten Puls dargestellt.

Die Pulsdauer bei gegebenem Spektrum ist für ungechirpte Pulse am geringsten, also dann, wenn alle Spektralkomponenten phasengleich überlagert sind. Die erreichbare minimale Pulsdauer hängt von der genauen zeitlichen Pulsform und damit dem Spektrum des Pulses ab und sie wird durch das sogenannte Bandbreiteprodukt $\Delta\nu\Delta t$ charakterisiert. Die Werte $\Delta\nu/\text{Hz}$ und $\Delta t/\text{s}$ beziehen sich jeweils auf die volle Halbwertsdauer bzw. die volle Halbwertsbreite des Spektrums des Pulses. Pulse mit minimaler Pulsdauer bezeichnet man als bandbreitebegrenzt oder auch fourierlimitiert. Pulse mit einem

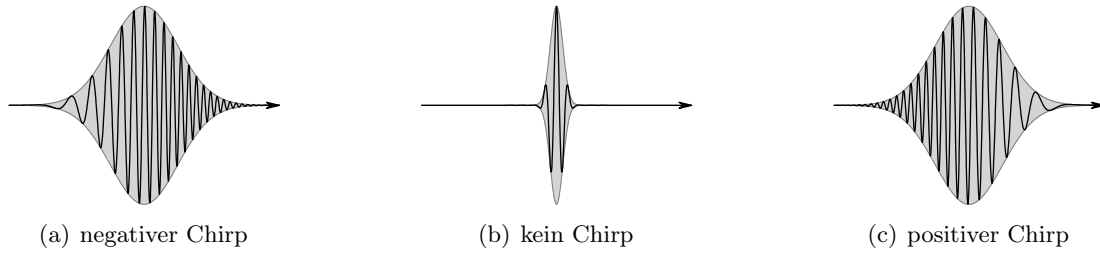


Abbildung 2.4: Laserpulse mit unterschiedlichem Chirp. Alle drei Pulse besitzen dasselbe Spektrum und dieselbe Zentralfrequenz. Man erkennt, dass der Puls ohne Chirp eine deutlich geringere Pulsdauer aufweist. Die einhüllende Gaußfunktion ist jeweils in grau hinterlegt.

gaußförmigen Intensitätsverlauf über die Zeit besitzen ein gaußförmiges Spektrum, hier gilt:

$$\Delta\nu\Delta t \geq \frac{2 \ln(2)}{\pi} \approx 0,441 \quad (2.28)$$

Eine weitere wichtige Pulsform, die in guter Näherung für die Pulse vieler Femtosekundenverstärkersysteme angenommen werden kann, ist:

$$I(t) = I_0 \operatorname{sech}^2(t/\tau) = I_0 \left(\frac{2}{e^{t/\tau} + e^{-t/\tau}} \right)^2 \quad (2.29)$$

Mit dem Zusammenhang $\Delta t = 1,76\tau$ zwischen der Breite der Einhüllenden τ und der Halbwertsdauer des Pulses Δt ergibt sich das Bandbreitprodukt $\Delta\nu\Delta t \geq 0,315$.

Offensichtlich ist es für die Spektroskopie mit höchster Zeitauflösung erforderlich, die unvermeidliche Dispersion der verwendeten Pulse zu kompensieren. Das erfolgt am einfachsten mit Kombinationen aus Gittern oder Prismen, die einen anormalen negativen Chirp erzeugen und auf diese Weise die Gruppengeschwindigkeitsdispersion kompensieren, die die Pulse beim Durchgang durch optische Materialien oder Luft erfahren haben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Pulskompression und die entsprechenden optischen Aufbauten als Kompressoren [108]. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Prismenkompressor und seine Funktionsweise wird in Abschnitt 3.1.2 ab. S. 31 beschrieben. Auf diese Weise lassen sich – eine entsprechende spektrale Bandbreite vorausgesetzt – standardmäßig Pulsdauern im Bereich von einigen zehn Femtosekunden erzielen. Für noch kürzere Pulse reicht die Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion allein nicht aus, es sind noch höhere Ordnungen des Chirps zu berücksichtigen. Die Kompression erfolgt dann z. B. mit *gechirpten* Spiegeln oder adaptiven Optiken.

Symmetrische Anordnungen von Gitter- oder Prismenpaaren werden auch in den Femtosekundenverstärkersystemen nach dem CPA-Prinzip eingesetzt. Das erste Paar dispersiver Elemente prägt dem Puls dabei bereits einen Chirp auf und führt zur räumlichen Trennung der Frequenzkomponenten. Nach dem Durchlaufen eines zweiten Paares dispersiver Elemente sind die Frequenzkomponenten wieder als ein kollimierter Strahl überlagert, wobei eine Vergrößerung der Pulsdauer um mehrere Größenordnungen und

eine entsprechende Verringerung der Spitzenintensität erreicht werden kann. Nach der Verstärkung des gechirpten Pulses durchläuft dieser dieselbe Anordnung in entgegengesetzter Richtung oder eine vergleichbare Anordnung aus zwei Paaren symmetrisch angeordneter dispersiver Elemente und wird so wieder komprimiert. Häufig wird nur ein Paar Dispersionsoptiken eingesetzt, welches in einem gefalteten Aufbau doppelt durchlaufen wird. Ein derartig gefalteter Prismenkompressor ist in Abbildung 3.2 auf Seite 31 schematisch dargestellt.

3 Das Experiment

Wer hohe Türme bauen will, muss lange
beim Fundament verweilen.

(Anton Bruckner)

3.1 Der Aufbau des IRMA-Experiments

In diesem Abschnitt wird der Aufbau des im Rahmen dieser Arbeit konzipierten Experimentes *IRMA*¹ beschrieben. Zunächst werden die wichtigsten Komponenten und eigene Entwicklungen vorgestellt, insbesondere das Programm zur Ansteuerung und Datenerfassung bzw. -verarbeitung. Anschließend werden die generell in den zeitaufgelösten Infrarotspektren auftretenden Effekte erläutert, die in der Auswertung der erhaltenen Messdaten zu berücksichtigen sind.

3.1.1 Laser

Basis des gesamten Experimentes ist das Femtosekundenlasersystem vom Typ CPA 2001 der Firma Clark MXR. Es besteht im Wesentlichen aus: Diodenlaser, modengekoppeltem Erbium-Glasfaserlaser, frequenzverdoppeltem gütegeschalteten Nd:YAG-Laser² und regenerativem Ti:Sa-Laser³, diese sollen kurz erläutert werden.

Der Diodenlaser ist ein typischer Halbleiterlaser (InGaAs⁴, III-V-Halbleiter), wie er auch in der Telekommunikation verwendet wird. Er emittiert kontinuierlich bei 980 nm mit einer Leistung von etwa 160 mW und dient als optische Pumpe für den Glasfaserlaser.

Der modengekoppelte Glasfaserlaser ist die Grundlage für die Erzeugung der Femtosekundenpulse. Als aktives Medium dient ein mit Er³⁺-Ionen dotierter Teil der Glasfaser, die Besetzungsinversion wird durch das über eine Faserverzweigung eingekoppelte Licht des Diodenlasers erreicht. Der Glasfaserlaser ist als Ringresonator aufgebaut und emittiert bei einer festen Wellenlänge von 1550 nm mit einer Repetitionsrate von 35 MHz. Die Modenkopplung erfolgt durch nichtlineare Polarisationsrotation in der Faserstrecke, diese basiert auf nichtlinearen optischen Effekten dritter Ordnung: Selbstphasenmodulation und Kreuzphasenmodulation [109]. Die Pulse werden über einen Polarisationsstrahlteiler ausgekoppelt, in einem Prismenkompressor auf eine Pulsdauer von etwa 100 fs komprimiert und anschließend in einem PPLN-Kristall auf 775 nm frequenzverdoppelt, dabei werden Pulsenergien von etwa 100 pJ erreicht.

¹IRMA: InfraRotMessAnlage

²Lasermedium: Neodym-dotiertes (Nd³⁺) Yttriumaluminiumgranat

³Lasermedium: Titan-dotierter (Ti³⁺) Saphir

⁴Indiumgalliumarsenit

Die Emission des Faserlasers wird über eine Photodiode aufgezeichnet und dient als interner Frequenz- und Zeitstandard des gesamten Lasersystems. Alle anderen Abläufe, wie z. B. Ein- und Auskopplung von Licht in den Verstärker sind über elektronische Frequenzteiler und Verzögerungsschaltungen mit dem modengekoppelten Signal synchronisiert. Außerdem stehen diverse Zeitsignale für die elektronische Synchronisation externer Geräte zur Verfügung.

Die Verstärkung der schwachen Femtosekundenpulse erfolgt nach dem CPA-Prinzip [110]. Sie werden auf eine Dauer von etwa 200 ps gestreckt, bevor sie in den Verstärker eingekoppelt werden. Es wird nicht jeder Puls verstärkt, die einstellbare Repetitionsrate des CPA lag bei 990 Hz, so dass etwa jeder 35000. Puls des Faserlasers genutzt wird.

Als Pumplichtquelle des regenerativen Verstärkers dient ein gütegeschalteter, frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser. Dessen aktives Medium wird von einer Hochdruck-Bogenlampe kontinuierlich gepumpt, beide Bauteile werden permanent wassergekühlt. Die Güteschaltung erfolgt durch einen akustooptischen Modulator (AOM) im Resonator, welcher durch Lichtbeugung an einer Ultraschallwelle die ungewollte Verstärkung spontaner Emission verhindert, so dass eine maximale Besetzungsinversion erreicht wird. Durch Ansteuerung des AOM, bzw. Abschalten seines Steuersignals wird der Resonator auf hohe Güte geschaltet und es baut sich ein kurzer intensiver Laserpuls mit einer Zentralwellenlänge von 1064 nm auf. Der wird in einem KTP-Kristall innerhalb des Resonators auf 532 nm frequenzverdoppelt, dieses Licht wird über einen dichroitischen Spiegel aus dem Resonator ausgekoppelt. Die erzielte Durchschnittsleistung lag bei etwa 7,5 W, was Pulsenergien von 7,5 mJ bei 532 nm entspricht.

Einige hundert Nanosekunden nach dem Triggersignal für den AOM wird mit der Einkopplung des Pumpimpulses im aktiven Medium des Verstärkers – ein mit Ti^{3+} -Ionen dotierter Saphirkristall (Al_2O_3) – maximale Besetzungsinversion erreicht. Gleichzeitig wird ein einzelner Puls des Faserlasers in den Ti:Sa-Resonator eingekoppelt, in mehreren Umläufen hochverstärkt und beim Erreichen der Sättigung – also maximaler Intensität – wieder ausgekoppelt. Ermöglicht wird diese im Englischen als *cavity dumping* bekannte Prozedur durch die Kombination aus einem polarisationsabhängigen Strahlteiler und einer Pockelszelle im Resonator. Das ist ein elektrooptisches Bauteil, das unter Anlegen einer definierten Hochspannung wie eine $\lambda/4$ Verzögerungsplatte wirkt. Die Drehrichtung des erzeugten zirkular polarisierten Lichtes wird durch Reflexion an einem Endspiegel umgekehrt und nach erneutem Passieren der Pockelszelle liegt wieder linear polarisiertes Licht mit um 90° gedrehter Polarisation vor. Zusammen mit einem Polarisationsstrahlteiler wirkt die Pockelszelle als Güteschalter und ermöglicht die präzise Ein- und Auskopplung eines Pulses in den Resonator.

Die ausgekoppelten, hochverstärkten Laserpulse werden in einem Gitterkompressor wieder komprimiert, die erreichte Pulsdauer liegt bei Annahme der $\text{sech}^2(t)$ Pulsform typischerweise bei 170 fs (vgl. Abb. 3.20(b), S. 70). Die erzielten Pulsenergien von $800 \mu\text{J}$ ergeben bei der verwendeten Repetitionsrate von etwa 1 kHz eine Durchschnittsleistung von 800 mW bei einer festen Zentralwellenlänge von 775 nm. Die Laserfundamentale ist linear polarisiert (horizontal) und besitzt ein nahezu gaußförmiges Intensitätsprofil mit einem Strahldurchmesser von etwa 8 mm.

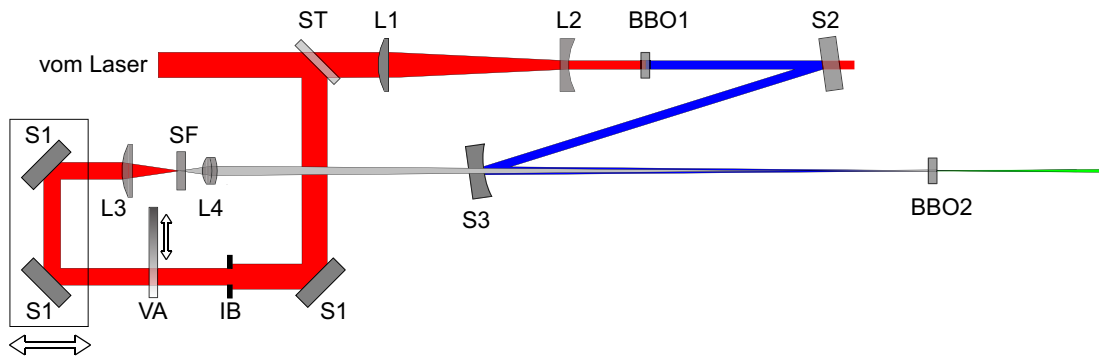


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des nichtkollinearen optisch parametrischen Verstärkers

3.1.2 Erzeugung der Anregungspulse im UV/vis-Bereich

Um die Anregungspulse zu generieren, wurden verschiedene Techniken der Frequenzkonversion durch nichtlineare optische Prozesse eingesetzt. Neben dem Erreichen einer hohen Konversionseffizienz wurde darauf geachtet, dass der Aufbau sehr kompakt gehalten wird. Das erhöht die Stabilität und erleichtert durch die gute Erreichbarkeit aller Elemente die Justage erheblich. Es wurden verschiedene Wellenlängen im Bereich von 258 nm bis 530 nm zur Anregung verwendet, die entweder durch den NOPA bzw. die Frequenzverdopplung der Laserfundamentalen oder durch zusätzliche Summenfrequenzmischung mit der Laserfundamentalen generiert wurden. Bei der direkten Verwendung der NOPA-Pulse wurden diese noch durch den Prismenkompressor komprimiert. Nach der Erzeugung der Anregungspulse kann ihre Polarisation durch Verdrehen einer computergesteuerten Verzögerungsplatte beliebig eingestellt werden. Im Folgenden werden alle dafür notwendigen Komponenten im einzelnen dargestellt.

Der nichtkollineare optisch parametrische Verstärker

Der NOPA dient der Erzeugung von Pulsen mit durchstimmbarer Wellenlänge im sichtbaren Spektralbereich sowie im nahen Infrarot aus der Laserfundamentalen [78, 80, 81]. Der Aufbau basiert auf den Konversionsprozessen der Frequenzverdopplung, Weißlichterzeugung und parametrischen Konversion und er ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Für den NOPA wird ein Teil der Laserfundamentalen von etwa $200 \mu\text{J}$ über einen Strahlteiler (nicht eingezeichnet) ausgekoppelt und über die im Folgenden beschriebenen Konversionsstufen umgewandelt.

Frequenzverdopplung (SHG) 97% der Laserfundamentalen passiert den Strahlteiler (ST⁵). In einem Teleskop aus zwei Linsen (L1⁶, L2⁷) im Abstand von 15 cm wird der

⁵ST: PR 775/3%/45°/ppol

⁶L1: $f = 200 \text{ mm}$

⁷L2: $f = -50 \text{ mm}$

Strahldurchmesser auf $1/4$ verkleinert was gleichzeitig die Intensität um den Faktor 16 vergrößert. Danach erfolgt die Frequenzverdopplung mit Typ I-Phasenanpassung in einem 0,5 mm dicken BBO-Kristall (BBO1: $\theta = 30^\circ$), der für beide Wellenlängen entspiegelt ist. Man erhält Pulsenergien von $50 \mu\text{J}$ bei 388 nm. Der Anteil der nicht konvertierten Fundamentalen wird über den dielektrisch beschichteten Spiegel (S2⁸) ausgekoppelt und anschließend abgeblockt oder für weitere Mischprozesse verwendet. Das frequenzverdoppelte Licht wird auf den Hohlspiegel (S3⁹) reflektiert, der unterhalb der Ebene aller übrigen Optiken steht.

Weißlichterzeugung 3% der zur Verfügung stehenden Pulsenergie werden durch den Strahlteiler ST abgetrennt und zur Weißlichterzeugung genutzt. Der Strahl wird mit einer Linse (L3¹⁰) in ein 2,3 mm dickes Saphirfenster (SF) fokussiert. Dessen optische Achse ist senkrecht zu den Fensterflächen orientiert, so dass kein Einfluss der Doppelbrechung zu erwarten ist. Mit einem Präzisionsverschiebetisch (nicht eingezeichnet) kann das Substrat in Strahlrichtung verschoben werden um die relative Position zum Fokus optimal einzustellen. Die numerische Apertur und Intensität lassen sich durch die Kombination aus Irisblende (IB) und variablem Abschwächer (VA) praktisch stufenlos justieren, so dass stabiles Einzelfilamentweißlicht leicht einzustellen ist. Das resultierende breitbandige Licht wird mit einer achromatischen Linse (L4¹¹) kollimiert, bzw. kurz vor dem NOPA-Kristall fokussiert.

Parametrische Verstärkung Die parametrische Verstärkung mit Typ I-Phasenanpassung findet in einem 2 mm dicken BBO-Kristall statt (BBO2: $\theta = 28,5^\circ$). Da keine Antireflexbeschichtung (AR) für den gesamten Spektralbereich zur Verfügung steht wurde statt dessen eine Oberflächenschutzbeschichtung (p-coating¹²) eingesetzt. Der Kristall ist in einer Präzisionsrotationshalterung gelagert und kann zur Einstellung der Phasenanpassung um eine horizontale Drehachse verkippt werden. Durch Veränderung der Strahlhöhe auf dem Hohlspiegel S3 kann nun der optimale Winkel zwischen dem aufwärts gerichteten Pumpstrahl und dem horizontalen Weißlichtstrahl eingestellt werden. Dieser beträgt etwa $6,5^\circ$ außerhalb bzw. $3,7^\circ$ innerhalb des Kristalls. Die Einkopplung des Pumpstrahls erzeugt die auf einem Konus emittierte parametrische Fluoreszenz.

Bei optimaler Justage zeigt dieser Superfluoreszenzring keinen Farbverlauf und sein niedrigstes Segment verläuft kollinear mit dem Weißlicht. Dieses besitzt einen positiven Chirp und eine entsprechend verlängerte Pulsdauer, es werden also nur die Frequenzanteile des Kontinuums parametrisch verstärkt, die im Medium räumlich und zeitlich mit dem Pumpimpuls überlappen. Da die Phasenanpassung im NOPA für einen breiten Spektralbereich von etwa 500 nm bis 750 nm erfüllt ist, lässt sich die Wellenlänge des Signals durch die Anpassung der Weglänge der Kontinuumserzeugung wählen. Es kann

⁸S2: HR 388/0°

⁹S3: HR 395/0°, $r = 50 \text{ cm}$

¹⁰L3: $f = 100 \text{ mm}$

¹¹L4: $f = 30 \text{ mm}$

¹²engl.: protection coating

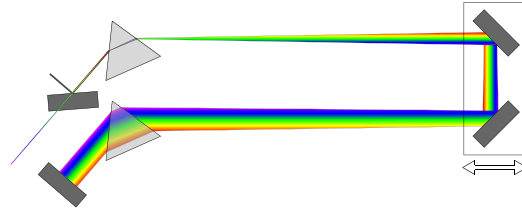


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des gefalteten Prismenkompressors.

auch Verstärkung im nahen Infrarotbereich erreicht werden, hier ist jedoch der Phasen Anpassungswinkel für jede Wellenlänge zu optimieren, die Winkelunabhängigkeit ist nicht mehr gegeben.

Im Sichtbaren lassen sich Wellenlängen von etwa 460 nm bis 700 nm und im nahen Infrarot von etwa 900 nm bis 1200 nm erzeugen. Die erreichbaren Pulsenergien hängen von der eingestellten Wellenlänge ab und liegen im Bereich einiger Mikrojoule. Sowohl Signal als auch Idler sind linear polarisiert, die Polarisations ebene ist horizontal orientiert. Eine Blende (nicht eingezeichnet) trennt das Signal von Idler, unkonvertiertem Pumplicht und parametrischer Fluoreszenz. Dann wird es über einen silberbeschichteten, sphärischen Spiegel ($r = 50$ cm, nicht eingezeichnet) kollimiert und steht nach Kompression oder Summenfrequenzmischung als Anregungslicht zur Verfügung.

Prismenkompressor

Beim NOPA-Prozess bleibt der dem Superkontinuum aufgeprägte Chirp auch im verstärkten Licht erhalten und die Bandbreite übertrifft die des Lasersystems. Dementsprechend lassen sich die spektral breiten Signalepulse durch eine Kompensation dieses positiven Chirps weit unter die 170 fs Pulsdauer des verwendeten Lasersystems komprimieren, Pulsdauern von einigen zehn Femtosekunden sind ohne allzu großen Aufwand erreichbar.

Zur Kompression müssen folglich Komponenten eingesetzt werden, die eine negative Dispersion verursachen, hierzu wurde eine Kombination aus zwei Dispersionsprismen verwendet [111]. Die Funktionsweise ist in Abbildung 3.2 illustriert: Ein von links unten einfallender Strahl wird vom ersten Prisma gebrochen. Das dispergierte Licht wird durch zwei Spiegel reflektiert und trifft dort auf das zweite Prisma. Dieses erzeugt eine negative Dispersion, weil sich die Strecken der Spektralkomponenten im optisch dichteren Medium des Prismas wegen ihrer räumlichen Anordnung unterscheiden. Das Maß an negativer Dispersion wird durch den Abstand zwischen beiden Prismen festgelegt, der bei dem gefalteten Aufbau durch Verschiebung der auf einer optischen Bank montierten Spiegel einstellbar ist. Der Strahlengang wird nach Reflexion am Endspiegel erneut durchlaufen, so dass alle Spektralkomponenten wieder räumlich überlagert werden und sich die dispersiven Effekte verdoppeln. Die Reflexion erfolgt leicht nach unten geneigt und die komprimierten Pulse werden durch den unterhalb des einlaufenden Strahls stehenden Spiegel ausgekoppelt. Dieser Aufbau ist kostengünstig, leicht zu justieren und sehr robust, daher wurde die Verwendung von Gittern [108] nicht in Betracht gezogen.

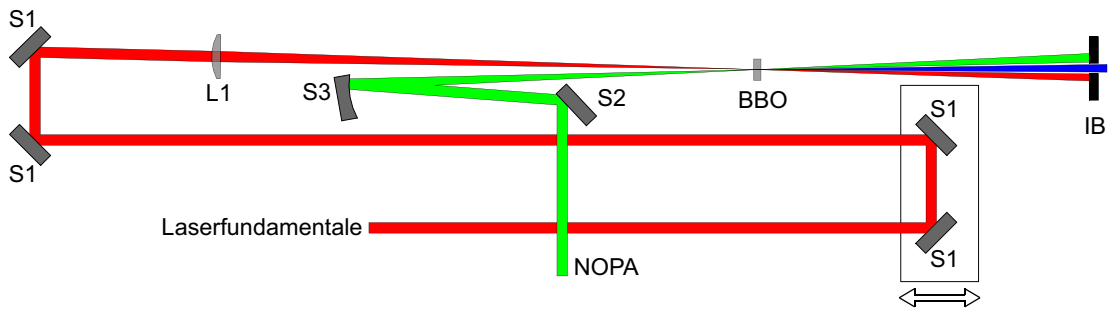


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau der Summenfrequenzerzeugung.

Es werden Silberspiegel und bereits vorhandene, gleichseitige Quarzglasprismen eingesetzt. Selbst bei symmetrischem Strahlengang in den Prismen unterscheidet sich der Einfallswinkel (47°) deutlich vom Brewsterwinkel (56° , $n = 1,46$), trotzdem stand genug Pulsenergie zur Verfügung, so dass eine AR-Beschichtung nicht erforderlich war. Der Wechsel auf Prismen aus dem optisch dichteren Flintglas (SF10, $n = 1,7$) würde die Reflexionsverluste deutlich senken, denn für eine symmetrische Strahlführung im Brewsterwinkel ($59,7^\circ$) liegt dann der optimale Apexwinkel bei $60,6^\circ$. Wegen der höheren Dispersion könnte außerdem ein wesentlich kompakterer Aufbau mit einer verkürzten Spiegelstrecke realisiert werden [112].

Zum Erreichen sehr kurzer Pulse ist auch die Kompensation höherer Ordnungen des Chirps notwendig. Schon die gleichzeitige Reduktion des linearen und des quadratischen Chirps lässt sich mit Prismen allein nicht erreichen, jedoch könnten Prismen mit Gittern [112, 113] oder mit adaptiven Optiken kombiniert werden [114]. Der experimentelle Aufwand wäre hier aber nicht zu rechtfertigen, zumal die Zeitauflösung im Infraroten ohnehin durch den IR-Abtastpuls begrenzt wird.

Summenfrequenzmischung und Frequenzverdreifung

Die Verstärkung von Licht unterhalb von 460 nm ist mit dem NOPA allein nicht mehr möglich. Nach Aufwärtskonvertierung der durchstimmbaren NOPA-Pulse steht aber der gesamte Bereich von 290 nm bis 360 nm sowie von 410 nm bis 450 nm bzw. durch Frequenzverdreifung die Wellenlänge von 258 nm zur Verfügung. Für die zeitaufgelöste Spektroskopie im mittleren Infrarot sind die Pulsdauern der SFG von etwa 150 fs ausreichend kurz. Wegen der geringeren Pulsenergie und der größeren Reflexionsverluste für s-polarisiertes Licht an den Prismen wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine Kompression der SFG-Pulse verzichtet. Diese ist jedoch mit speziell AR-beschichteten Dispersionsprismen möglich [115].

Summenfrequenzmischung Der schematische Aufbau der SFG ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Fundamentale wird über dielektrische Spiegel ($S1^{13}$) geführt, ihre

¹³S1: HR 775/45°/ppol

Weglänge wird durch einen Verschiebeschlitten exakt an das NOPA-Licht angeglichen. Dabei wird der nach der SHG im NOPA noch vorhandene Anteil der Laserfundamentalen genutzt, der vom dielektrischen Spiegel (S2 in Abb. 3.1) transmittiert wird. Es stehen etwa $100 \mu\text{J}$ Pulsenergie bei 775 nm zur Verfügung. Die Fokussierung erfolgt durch eine Linse (L1¹⁴) einige Zentimeter vor den SFG-Kristall, die Intensität wird ggf. durch ND-Filter¹⁵ so abgeschwächt, dass keine parametrische Fluoreszenz auftritt. Das NOPA-Licht wird über Silberspiegel (S2) gelenkt und mit einem silberbeschichteten, sphärischen Spiegel (S3¹⁶) ca. einen Zentimeter vor den Kristall fokussiert. Die SFG erfolgt unter Typ I-Phasenanpassung in einem $100 \mu\text{m}$ dicken BBO-Kristall, wobei Kristalle mit optimierten Schnittwinkel für verschiedene Wellenlängen eingesetzt wurden (vgl. Tab. 3.1 auf S. 37). Zur Ausrichtung der optischen Achse ist der Kristall auf einem Präzisionsdrehtisch um eine horizontale Achse drehbar gelagert. Wegen des kleinen Winkels zwischen den beiden einlaufenden Strahlen kann das in der Mitte auftauchende Summenfrequenzsignal durch eine Irisblende (IB) vom unkonvertierten Licht getrennt und über einen aluminiumbeschichteten Hohlspiegel ($r = 40 \text{ cm}$, nicht eingezeichnet) kollimiert werden. Das SFG-Licht ist linear (vertikal) polarisiert, die erreichten Pulsenergien liegen bei über $1 \mu\text{J}$.

Frequenzverdreifachung Für Frequenzverdreifachung (THG¹⁷) wird der Aufbau zur Summenfrequenzmischung leicht modifiziert, so dass statt der NOPA-Pulse direkt die SHG mit der Laserfundamentalen gemischt wird. Statt des Hohlspiegels (S3 in Abb. 3.1) wird ein Auskoppelspiegel (PR 388/60%/0°) eingesetzt, die Strahlführung erfolgt jetzt horizontal über dem optischen Tisch. Mit Neutralglasfiltern wird die Pulsenergie auf etwa $4,5 \mu\text{J}$ gemindert. Nach dem Passieren einer Verzögerungsplatte ($\lambda/2 @ 390 \text{ nm}$) ist die Polarisation um 90° gedreht, die Polarisationsebene liegt horizontal. Der weitere Strahlengang ist analog zu dem des NOPA-Lichtes bei der SFG, wobei dielektrisch beschichtete Laser- und Umlenkspiegel anstelle der Silberspiegel verwendet werden. Die Frequenzverdreifachung erfolgt durch Summenfrequenzmischung mit der Laserfundamentalen (Typ I-Phasenanpassung), die resultierenden Pulse bei 258 nm besitzen also eine vertikale Polarisation. Es konnten Pulsenergien von über $1 \mu\text{J}$ erreicht werden.

Auf eine Pulskompression wurde hier verzichtet, da die Reflexionsverluste an den vorhandenen Prismen für das s-polarisierte SFG- und THG-Licht zu hoch wären. Prinzipiell lassen sich jedoch mit gechirpten Fundamentalpulsen noch höhere Konversionseffizienzen erzielen. Diese Pulse wären nach der Kompression mit speziellen, AR-beschichteten Prismen intensiv genug als Anregungslicht [115].

¹⁴L1: $f = 250 \text{ mm}$

¹⁵Neutralglasfilter ermöglichen eine definierte, wellenlängenunabhängige Abschwächung der Lichtintensität

¹⁶S3: $r = 40 \text{ cm}$

¹⁷engl.: Third Harmonic Generation

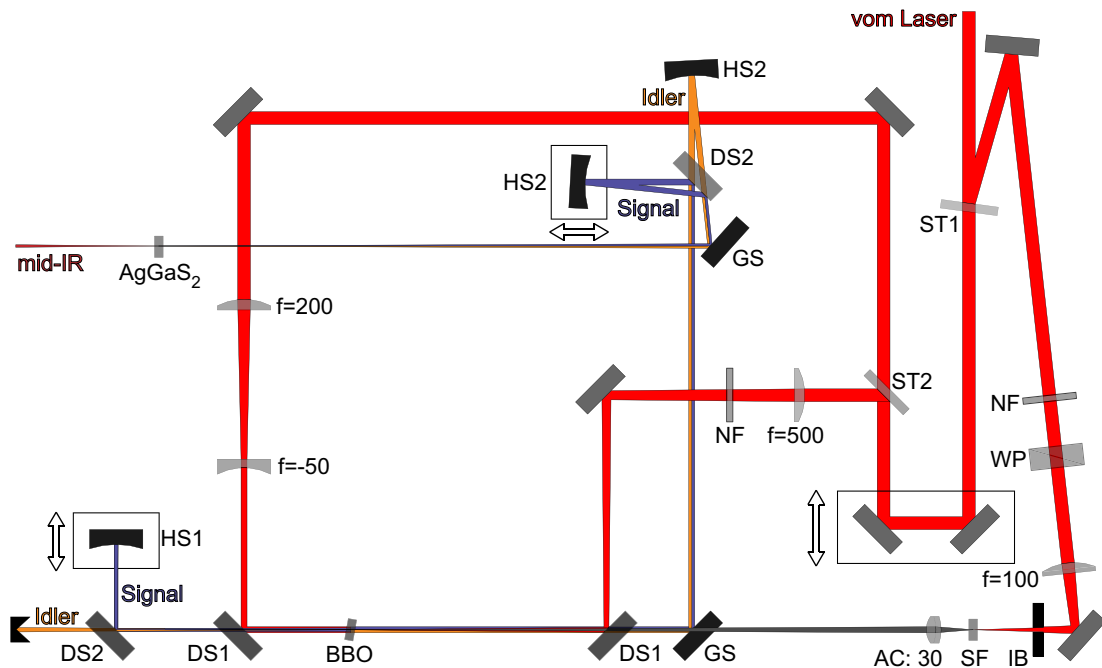


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau der Infraroterzeugung mit zweistufigem OPA und Differenzfrequenzmischung. Es sind nur die wesentlichen Optiken dargestellt, einige Blenden und ND- sowie Farbglasfilter wurden nicht eingezeichnet. Für Linsen ist die Brennweite in Millimetern angegeben. Bei den unbeschrifteten Optiken handelt es sich um dielektrische Umlenkspiegel für die Laserfundamentale (HR 775/45°/ppol)

AC: achromatische Linse, DS: dichroitischer Spiegel, GS: Goldspiegel, HS: sphärischer Hohlspiegel, IB: Irisblende, NF: ND-Filter, SF: Saphirfenster, ST: Strahlteiler, WP: Verzögerungsplatte ($\lambda/2$).

3.1.3 Erzeugung der Abtastpulse im mittleren Infrarotbereich

Aufgabe war es, durchstimmbare, breitbandige, kurze Pulse im MIR-Bereich von $3\ \mu\text{m}$ bis $10\ \mu\text{m}$ mit Pulsenergien im Mikrojoulebereich zu erzeugen. Dies lässt sich auf unterschiedliche Arten erreichen¹⁸: So kann durch optisch parametrische Verstärkung in geeigneten nichtlinearen Medien direkt der MIR-Bereich erreicht werden [116, 117]. Wesentlich häufiger findet sich die Anwendung der Differenzfrequenzmischung. Dabei unterscheidet sich insbesondere die Art, wie die zu mischenden Grundwellen erzeugt werden: durch zwei gekoppelte Femtosekundenlaser mit unterschiedlichen Wellenlängen [118–120] oder durch optisch nichtlineare Frequenzkonversion [121–125]. Eine gute Übersicht wird z. B. in [126] präsentiert.

Der in dieser Arbeit konzipierte und realisierte Aufbau (Abb. 3.4) basiert ebenfalls auf einer mehrstufigen Frequenzkonversion. Als Vorbild diente eine Anlage der Gruppe von Prof. Hamm an der Universität Zürich, die sich als leicht zu justieren sowie extrem

¹⁸alle Beispiele basieren auf der Konversion von Pulsen eines Femtosekundenverstärkersystems mit etwa 800 nm Wellenlänge

rauscharm und stabil erwiesen hat [127]. Die IR-Erzeugung erfolgt in mehreren Prozessen: ein zweistufiger OPA erzeugt Signal- und Idlerpulse im nahen IR, mit diesen erfolgt anschließend die DFG. Die einzelnen Stufen werden nun vorgestellt.

Optisch Parametrischer Verstärker Insgesamt stehen über $250 \mu\text{J}$ der Pulsenergie der Laserfundamentale zur Verfügung. Durch das gekeilte, einseitig breitbandentspiegelte (*BBAR*¹⁹) Fenster (ST1) werden etwa 4% der Laserfundamentale reflektiert und zur Weißlichterzeugung (siehe auch S. 30) eingesetzt. Eine Verzögerungsplatte (WP²⁰) dreht die Polarisationssebene auf vertikal. Die Weißlichterzeugung erfolgt dann in einem zufällig orientierten 4 mm dicken Saphirsubstrat. Das ist um die Strahlachse drehbar gelagert, was die Ausrichtung der optischen Achse ermöglicht. Die übrige Anordnung ist vergleichbar mit der Kontinuumszeugung im NOPA. Das entstandene Weißlicht wird ebenfalls durch einen Achromaten mit 30 mm Brennweite kollimiert bzw. fokussiert.

Der überwiegende Anteil der Laserfundamentale wird über eine Umwegstrecke geführt und es werden durch einen weiteren Strahlteiler (ST2²¹) etwa $6 \mu\text{J}$ als Pumpuls für die erste Verstärkerstufe ausgekoppelt. Eine Linse mit $f = 500 \text{ mm}$ fokussiert dieses Licht direkt in den OPA-Kristall und die Intensität wird mit ND-Filtern so eingestellt, dass dort keine parametrische Fluoreszenz entsteht. Die Justage der Strahlen erfolgt derart, dass Weißlicht- und Pumpstrahl ab dem dichroitischen Spiegel DS1²², exakt auf einer Achse liegen.

Die optisch parametrische Verstärkung erfolgt in einem 4 mm dicken BBO-Kristall (BBO: $\theta = 27^\circ$, $\phi = 30^\circ$) mit Typ II-Phasenanpassung. Das entstehende Signal ist im Wellenlängenbereich von $1,2 \mu\text{m}$ bis $1,45 \mu\text{m}$ durchstimmbar und vertikal polarisiert. Der Idler entsteht kollinear mit dem Signal, hat Wellenlängen von $1,68 \mu\text{m}$ bis $2,2 \mu\text{m}$ und ist horizontal polarisiert. Der dichroitische Spiegel DS2²³ reflektiert das Signal, während der Idler transmittiert und abgeblockt wird.

Das Signal wird durch einen goldbeschichteten Hohlspiegel (HS1²⁴) kollimiert und dient nun als Seedlicht für die zweite Verstärkerstufe, für die derselbe Kristall genutzt wird. Die verbleibende Laserfundamentale mit über $200 \mu\text{J}$ Pulsenergie dient als Pumpstrahl, sie wird im Strahldurchmesser auf $1/4$ verkleinert und über den dichroitischen Spiegel DS1 mit dem Seedlicht überlagert. Auch hier wird der Pumpstrahl zuvor so abgeschwächt, dass keine parametrische Fluoreszenz im BBO-Kristall auftritt. Die Strahlführung der zweiten Pumpstufe erfolgt leicht nach unten geneigt, so dass die resultierenden, hochverstärkten Signal- und Idlerpulse unterhalb des Weißlichtstrahls der ersten Stufe laufen und von dem niedriger angeordneten Goldspiegel (GS) ausgekoppelt werden. Von Signal und Idler zusammen werden insgesamt Pulsenergien von bis zu $40 \mu\text{J}$ erreicht.

¹⁹engl.: BroadBand AntiReflection coating

²⁰WP: $\lambda/2$ bei 775 nm

²¹ST2: PR $775/3\%/45^\circ/\text{ppol}$

²²DS1: HR $775/45^\circ/\text{ppol}$ + HT 1200–2500

²³DS2: HR 1200–1450/ $45^\circ/\text{spol}$ + HT 1680–2300/ $45^\circ/\text{ppol}$

²⁴HS1: $r = 50 \text{ cm}$

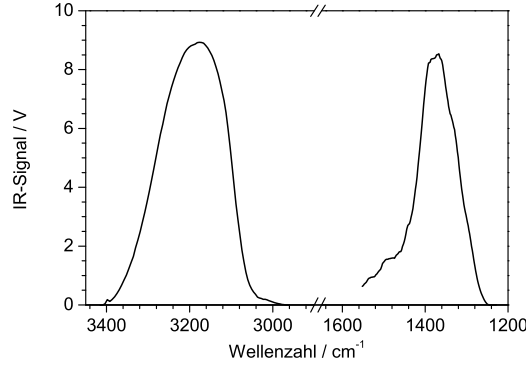


Abbildung 3.5: Spektren der Infrarotpulse für zwei verschiedene Einstellungen an den Rändern des durchstimmbaren Bereiches. Die Spektren wurden nicht normiert, aber mit verschiedenen Gittern und IR-ND-Filtern aufgenommen, die Pulsenergie bei 3000 cm^{-1} war weitaus größer als bei 1300 cm^{-1} .

Die Wellenlänge wird simultan für beide Verstärkerstufen durch das Verdrehen des Kristalls um eine vertikale Achse eingestellt. Im Gegensatz zum NOPA hängt die verstärkte Wellenlänge hier nicht nur von der relativen Verzögerung von Pump- und Seedpuls ab, diese ist in der zweiten Stufe jedoch kritisch hinsichtlich der erzielten Pulsenergie und Stabilität. Der Spiegel HS1 wurde daher auf einem hochwertigen Verschiebetisch gelagert, der über einen Differentialmikrometerantrieb eine besonders feinfühligte Justage erlaubt.

Differenzfrequenzerzeugung Vor der Konversion ins MIR werden Signal und Idler durch den dichroitischen Spiegel DS2 getrennt, so dass die optimale Zeitverzögerung beider Pulse für die DFG eingestellt werden kann, dazu dient wieder ein Verschiebetisch mit Differentialmikrometerantrieb. Beide Strahlen werden über die sphärischen, goldbeschichteten Spiegel (HS2) ($r = 100\text{ cm}$) in den $1,5\text{ mm}$ dicken Silberthiogallatkristall (AgGaS_2 : $\theta = 40^\circ$, $\phi = 45^\circ$) fokussiert. Die DFG erfolgt mit Typ I-Phasenanpassung, das entstehende Licht im mittleren Infrarot ist linear horizontal polarisiert, es werden Pulsenergien im μJ Bereich erzielt.

Die Wellenlängen aller an den Mischprozessen beteiligten Komponenten sind über die Energieerhaltung miteinander verknüpft, mit einer Laserwellenlänge von 775 nm ergibt sich der Zusammenhang zwischen Signal und Idler:

$$\lambda_{\text{idler}} = \frac{1}{1/775\text{ nm} - 1/\lambda_{\text{sig}}} = \frac{\lambda_{\text{sig}} \times 775\text{ nm}}{\lambda_{\text{sig}} - 775\text{ nm}} \quad (3.1)$$

und somit auch die Wellenlänge des IR-Lichtes nach der DFG:

$$\lambda_{\text{IR}} = \frac{1}{1/\lambda_{\text{sig}} - 1/\lambda_{\text{i}}} = \frac{\lambda_{\text{sig}} \times 775\text{ nm}}{1550\text{ nm} - \lambda_{\text{sig}}} \quad (3.2)$$

Das Einstellen einer anderen DFG-Wellenlänge erfordert also das Verstellen des OPA, gleichzeitig muss der AgGaS_2 -Kristall zur Phasenanpassung um eine horizontale Achse verkippt werden. Eine anschließende Anpassung aller Parameter, insbesondere der

Zweck	λ	Substrat	$\theta/^\circ$	$\phi/^\circ$	d/mm	Beschichtung	Seite
SHG	388 nm	BBO	30	0	0,5	AR 775/388	29
NOPA	460–1200 nm	BBO	28,5	0	2	p-coating	30
SFG	410–460 nm	BBO	26	0	0,1	p-coating	32
SFG	290–360 nm	BBO	36	0	0,1	p-coating	32
SFG	230–350 nm,	BBO	45	0	0,1	p-coating	69
THG	258 nm	BBO	45	0	0,1	p-coating	33
IR-OPA	1200–2300 nm	BBO	27	30	4	p-coating	35
IR-DFG	3–10 μm	AgGaS ₂	40	45	1,5	BBAR	36

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten optisch nichtlinearen Kristalle. Die Querschnittsfläche aller Kristalle ist $5 \times 5 \text{ mm}^2$. Eine genauere Beschreibung findet sich auf den angegebenen Seiten in den einzelnen Abschnitten.

Verzögerungsstrecken, erlaubt die Optimierung auf Pulsenergie und Stabilität der Infraroterzeugung. Die kollinear mit dem mittelinfraroten Licht laufenden Signal- und Idlerstrahlen werden durch einen Langpassfilter aus einem Germaniumsubstrat (LOT-Oriel, $3,6 \mu\text{m}$ cut on) vollständig unterdrückt.

Der mit DFG erreichbare durchstimmbare Spektralbereich liegt bei $3 \mu\text{m}$ bis $10 \mu\text{m}$, die Pulsenergie im Bereich von μJ und die Breite der Spektren (FWHM²⁵) bei 100 cm^{-1} bis 200 cm^{-1} . Die Pulsdauer ist $< 0,2 \text{ ps}$, wie Messungen der instantanen Absorptionsänderungen in einem Zinkselenid-Substrat (ZnSe) zeigen (vgl. Abb. 3.19 auf S. 69). Abbildung 3.5 zeigt Spektren für zwei verschiedene Einstellungen der Anlage, welche jeweils den Rand des in dieser Arbeit untersuchten Spektralbereiches repräsentieren.

3.1.4 Der Messplatz

Abbildung 3.6 zeigt den schematischen Aufbau des Messplatzes und die Strahlführung von Anreg- und Abtastlicht nach der Frequenzkonversion. Der gesamte Aufbau ist gekapselt und wird mit trockener, CO_2 -freier Luft gespült, die ein Spülgasgenerator von Typ PG85L (CMC Instruments, Eschborn) durch Reinigung von Druckluft in Molekularsieben erzeugt (vgl. Abschnitt 3.3.2, S. 64). Der Vorratsbehälter des Detektors für flüssigen Stickstoff befindet sich außerhalb, so dass die Befüllung während der Messung problemlos möglich ist, das Anregungs- und Abtastlicht wird durch Bohrungen in den Kasten eingestrahlt.

Das durch den DFG-Prozess generierte, divergierende Licht im mittleren IR wird durch einen Hohlspiegel wieder kollimiert und unter einem kleinen Winkel auf den etwas niedriger stehenden Goldspiegel reflektiert, der es zum Strahlteiler ST ablenkt. Dieser Strahlteiler besteht aus einem unbeschichteten, gekeilten CaF_2 -Substrat ($30'$). Der Vorderseitenreflex wird als *Signal* genutzt und der unter einem Winkel von 1° dazu reflektierte Rückseitenreflex als *Referenz*, während der größte Teil des IR-Lichtes transmittiert und danach abgeblockt wird. Der nicht als Abtastlicht benötigte Anteil könnte in

²⁵engl.: Full Width at Half Maximum (volle Halbwertsbreite)

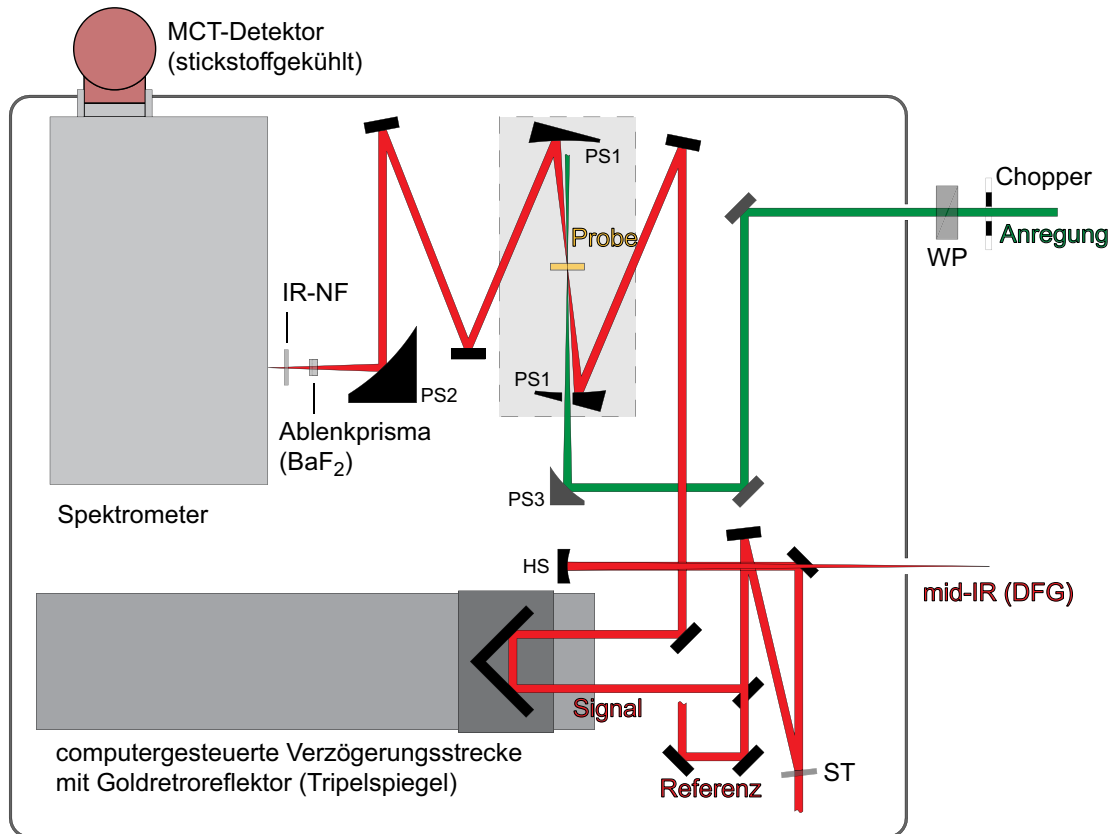


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau des Messplatzes. Der gesamte Bereich ist gekapselt und wird mit trockener, CO₂-freier Luft gespült. Für die Strahlführung des infraroten Abtastlichtes wurden ausschließlich goldbeschichtete Spiegel (schwarz) verwendet, für das Anregungslicht silber- oder aluminumbeschichtete (grau). Am Strahlteiler ST entstehen zwei Reflexe die als Signal und Referenz dienen. Diese laufen übereinander und nur der niedrigere wird über die Umwegstrecke geleitet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Referenzstrahlengang deshalb nur unvollständig eingezeichnet. HS: Hohlspiegel ($r = 100$ cm), IR-NF: Infrarot-Neutralfilter (Germanium), PS: Parabolspiegel, ST: Strahlteiler (gekeiltes CaF₂-Fenster, 30'), WP: computergesteuerte Verzögerungsplatte (vgl. Abschnitt 3.1.4, S. 47)

Zukunft z. B. für IR-Anreg/IR-Abtast-Experimente als intensives Anregungslicht genutzt werden. Um derartige Anwendungen ohne eine grundlegende Modifikation des Aufbaus zu ermöglichen, wurde die notwendige Verzögerungsstrecke in den Abtastzweig der Anlage integriert. Außerdem kann so die korrekte Strahlführung über die Umwegstrecke anhand des detektierten Infrarotlichtes verifiziert werden.

Nur der an dieser Stelle einige Millimeter unterhalb der Referenz verlaufenden Signalstrahl wird durch einen Spiegel auf die optische Umwegstrecke gelenkt. Diese besteht aus einem computergesteuerten, hochpräzisen Verschiebetisch (ALS 10030, Aerotech, Nürnberg) mit Linearmotor und 30 cm Verfahrweg. Auf dem Schlitten ist ein Retroreflektor vom Typ OW25-05 (PLX, New York) montiert, der aus drei im rechten Winkel zueinander angeordneten, goldbeschichteten Spiegeln besteht und jeden Lichtstrahl mit einer Genauigkeit von $< 0,5''$ parallel versetzt zurückwirft. Die Position des Verschiebeschlittens – und damit des Reflektors – wird über einen integrierten Linearmaßstab mit einer Auflösung von $0,2 \mu\text{m}$ bestimmt. Da keine äußeren Kräfte einwirken, ist dies gleichzeitig die bidirektionale Genauigkeit der Positionierung. Mit dieser Auslegung lassen sich maximale Verzögerungszeiten von 2 ns mit einer Genauigkeit von etwa ± 2 fs erreichen.

Signal- und Referenzstrahl werden durch zwei Off-Axis-Parabolspiegel (PS1) mit einer effektiven Brennweite²⁶ von 11 cm in die Probe fokussiert und anschließend wieder kollimiert. Beide Paraboloiden sind fest an eine Grundplatte montiert, so dass ihre Fokalfpunkte aufeinanderfallen. Mit Hilfe von Bohrungen und Passtiften lassen sich Justagelehren und Küvetten präzise und einfach im Fokus der Optiken platzieren. Nur der Signalstrahl wird in den Brennpunkt der Optiken fokussiert, der Referenzfokus liegt wegen des Winkels zwischen beiden Strahlen etwa 1 mm darunter.

Anschließend werden beide Strahlen über einen 90° Off-Axis-Parabolspiegel (PS2) mit einer effektiven Brennweite von 10 cm in den Eintrittsspalt des Spektrometers fokussiert. Dabei werden sie durch je ein Bariumfluorid-Prisma mit einem Apexwinkel von 10° horizontal abgelenkt, so dass die Foki räumlich getrennt sind und auf die beiden Infrarotdetektorzeilen abgebildet werden. Durch verschiedene in einem Filterrad montierte Filter kann die Intensität der Abtastpulse vor dem Spektrometer noch weiter abgeschwächt und zudem die Störung durch sichtbares Streulicht ausgeschlossen werden.

Das Anregungslicht wird über einen aluminiumbeschichteten 90° -Parabolspiegel mit einer effektiven Brennweite von 20 cm exakt an dieselbe Stelle wie der Signalstrahl fokussiert. Da der Winkel zwischen Anregungs- und Abtastlicht in der Probe möglichst klein sein soll, erfolgt die Strahlführung durch eine Durchgangsbohrung im Parabolspiegel PS1. Die resultierenden fokalen Durchmesser wurden bereits von Heike Staudt im Rahmen ihrer Diplomarbeit [128] bestimmt, sie liegen bei $\approx 250 \mu\text{m}$ für das Abtast- und $\approx 300 \mu\text{m}$ für das Anregungslicht.

Ein in Phase mit dem Laser laufendes Unterbrecherrad (Chopper²⁷) blockiert jeden zweiten Anregungspuls, so dass die aufeinanderfolgenden Abtastpulse abwechselnd die

²⁶engl.: reflected effective focal length, Abstand vom Fokus bis zur Mitte der Optik

²⁷engl.: to chop – zerhacken

Gitter	d/mm^{-1}	$\lambda_B/\mu\text{m}$	$\lambda_{\min}/\mu\text{m}$	$\lambda_{\max}/\mu\text{m}$	RLD/(nm/mm)
1	300	4	2	6	10
2	150	6	3	9	20
3	75	8	4	12	40

Tabelle 3.2: Übersicht der in das Spektrometer eingebauten Gitter. Die Angaben beruhen auf Herstellerinformationen.

angeregte und die nicht angeregte Probe detektieren. Außerdem kann durch eine Verzögerungsplatte in einer computergesteuerten Rotationseinheit die Orientierung der Polarisationssebene des linear polarisierten Anregungslichtes beliebig variiert werden.

Spektrometer und IR-Detektor

Das verwendete Spektrometer Sure-Spectrum 250is (CHROMEX, Albuquerque, USA) ist in Czerny-Turner-Konfiguration aufgebaut. Es hat eine Brennweite von 250 mm und ist für Abbildungsfehler korrigiert, so dass sich ein scharfes Bild des gesamten Eintrittsspalts in der Detektorebene ergibt. Eingebaut sind drei verschiedene Gitter, die sich in Gitterkonstante d ²⁸ und Blazewellenlänge λ_{Bl} ²⁹ unterscheiden. Damit stehen unterschiedliche Auflösungen in den einzelnen Wellenlängenbereichen zur Verfügung. Für eine ebene Welle, die unter einem gegebenen Winkel auf ein Gitter trifft, ergibt sich die sogenannte Winkeldispersion:

$$\frac{d\beta}{d\lambda} = \frac{m}{d \cos(\beta)} \quad (3.3)$$

mit dem Winkel β zwischen der Gitternormalen und dem reflektierten Strahl, der Wellenlänge λ und der Interferenzordnung m . Der Zusammenhang zwischen Wellenlänge und Ablenkung in der Detektorebene ist nicht linear, deswegen ist die Angabe der Auflösung in Form eines Kanalabstandes oder der sogenannten reziproken linearen Dispersion (RLD ³⁰) nur für die angegebene Blazewellenlänge sinnvoll. Die Spezifikationen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Da die Gitter nur für den Bereich um ihre angegebene Blazewellenlänge eingesetzt wurden, konnten gemittelte Kanalabstände bestimmt und für die jeweilige Auswertung benutzt werden. Dabei wurde eine gute Übereinstimmung für überlappende Wellenlängenbereiche bei verschiedenen Messungen erhalten [128]. Insofern ist der aus der Kalibrierung resultierende Fehler vertretbar.

Das Spektrometer wird über die serielle Schnittstelle (RS232) angesteuert, alle wesentlichen Funktionen sind ins Messprogramm (vgl. Abschnitt 3.2, S. 51) implementiert. Es

²⁸Die Gitterkonstante wird in Gitterfurchen pro mm angegeben

²⁹Bei einem geblazten Gitter sind die Gitterfurchen schräg geritzt. Bei gegebener Interferenzordnung findet die geometrische Reflexion an den Furchen genau bei der Blazewellenlänge statt, das Reflexionsvermögen ist maximal.

³⁰engl.: Reciprocal Linear Dispersion

lassen sich die Gitter wechseln, die Wellenlänge einstellen und die Größe des Eintrittspalts von 0 bis 2 mm in Schritten von $2\ \mu\text{m}$ verändern.

Das dispergierte Infrarotlicht wird durch einen Detektor vom Typ MCT-12-32-0.50 (Infrared Systems Development, Winter Park, USA) aus zwei Zeilen mit je 32 Elementen aus Quecksilber-Cadmium-Tellurid (MCT³¹) detektiert. Es handelt sich um hochempfindliche Photoleiter – also Quantendetektoren, die den inneren Photoeffekt ausnutzen. Gemessen wird die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit in den Halbleitern nach der Absorption eines IR-Photons. Der zugängliche Spektralbereich erstreckt sich von $< 1\ \mu\text{m}$ bis ca. $13\ \mu\text{m}$, die maximale Empfindlichkeit liegt bei $12\ \mu\text{m}$. Der Detektor muss während der Messung permanent mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden, er verfügt über ein Dewargefäß mit einer Standzeit von über acht Stunden. Die Detektorelemente besitzen Abmessungen von $0,5 \times 0,5\ \text{mm}^2$ und sind durch $0,1\ \text{mm}$ breite Lücken getrennt, der mittig gemessene Abstand beider Detektorzeilen beträgt $8\ \text{mm}$.

Digitalisierung der Messwerte

Zur Datenaufnahme wurde ein speziell auf den verwendeten Detektor abgestimmtes IR6416-Vielkanalintegratorsystem (Infrared Systems Development, Winter Park, USA) verwendet. Es besteht aus fünf parallelen Einheiten von Vorverstärkern, Boxcar-Integratorsystem, Auslese- und Halteelektronik, Multiplexer und Analog-Digital-Wandlern (ADC³²) sowie Speicher- und Datentransferelektronik. Das gesamte System wird über ein TTL-Steuersignal³³ mit dem Lasersystem synchronisiert.

Jedes Detektorelement wird über einen eigenen Vorverstärker mit der notwendigen Vorspannung versorgt, die Signale werden etwa um den Faktor 200 verstärkt. Die Integrator- und Halteglieder verarbeiten jeweils 16 Kanäle simultan. Die Integrationszeit für die Signale lässt sich zwischen $54\ \text{ns}$ und $2,6\ \mu\text{s}$ einstellen, die Verzögerung zwischen $30\ \text{ns}$ und $520\ \text{ns}$. Die 16 Kanäle jeder Einheit werden über jeweils einen Multiplexer und ADC im Bereich von $-10\ \text{V}$ bis $+10\ \text{V}$ mit einer Auflösung von 16 Bit digitalisiert und die Werte in einem schnellen FIFO-Speicher³⁴ abgelegt. Das System zeichnet sich durch eine hohe Linearität und ein geringes Rauschen aus. Es lassen sich bis zu eine Million Werte also die Daten für über 10000 Laserschüsse aufnehmen und speichern. Das entspricht hier einer Messdauer von 10 s.

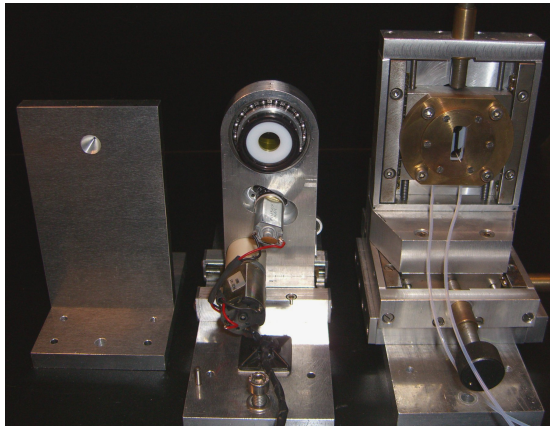
Für das Auslesen der 64 Detektorkanäle werden vier der fünf Einheiten benötigt, die fünfte erlaubt prinzipiell die simultane Erfassung von bis zu 16 weiteren, externen Messgrößen. Bei der hier vorliegenden Ausführung sind nur die ersten acht dieser externen Eingänge beschaltet, diese werden nicht verstärkt aber ebenso wie die MCT-Signale integriert und gewandelt. Im Allgemeinen wurde nur das Signal einer Photodiode, die hinter dem Unterbrecherrad des Abtaststrahlenganges positioniert war, über einen

³¹engl.: Mercury Cadmium Telluride

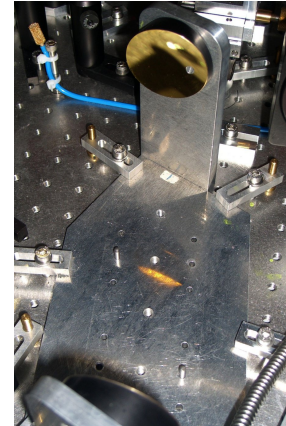
³²engl.: Analog to Digital Converter

³³Transistor-Transistor-Logik, „0“: $\approx 0\ \text{V}$ und „1“: $\approx 5\ \text{V}$

³⁴engl.: First In First Out



(a) Justagelehre und Küvetten



(b) Grundplatte

Abbildung 3.7: Die Rotations- und Durchflussküvette (mitte und rechts) sowie die Lehre zur Vorjustage (links) sind auf der Unterseite mit Passbohrungen versehen, die einen einfachen und schnellen Austausch der gesamten Einheit mit hoher Positioniergenauigkeit ermöglichen (a). Die zugehörige Grundplatte bildet eine Einheit mit den Parabolspiegeln (b). Die Bohrungen und zwei der Stifte sind gut zu erkennen, ebenso die Durchgangsbohrung zur Einkopplung des Anregungslichts im hinteren Parabolspiegel.

externen Eingang eingelesen. So lassen sich für jeden Laserschuss zweifelsfrei die Zustände *mit* und *ohne* Anregungslicht unterscheiden.

Das gesamte System ist für Repetitionsraten von 0 bis 2 kHz ausgelegt und über die mitgelieferte PC-Einsteckkarte können die Daten mit 10 MHz bei 32 Bit Bandbreite sehr schnell an den Rechner übertragen werden. Datenaufnahme und -transfer erfolgt programmgesteuert über die mitgelieferten LabVIEW-Routinen des Herstellers – genauso wie die Einstellung der Integrationsparameter. Diese Programme wurden in die selbstentwickelte Software integriert (vgl. Abschnitt 3.2 ab S. 51). Mit einem Oszilloskop wurde der Signalverlauf mit dem Integrationsfenster verglichen und die optimale Verzögerungszeit eingestellt, während die Integrationszeit für jede Messung so festgelegt wurde, dass die Signale im Dynamikbereich des ADC lagen.

Küvettendesign

Für die Messung der transienten Absorptionsänderungen ist im Allgemeinen ein schneller Austausch der Probe im Anregungsfokus notwendig, um identische Messbedingungen für jeden Laserschuss und somit jede Einzelmessung zu garantieren. Bei einem Durchmesser des Anregungsfokus von $300 \mu\text{m}$ muss die Probe innerhalb von einer Millisekunde – der Zeit zwischen zwei Laserschüssen – um diese Strecke bewegt werden. Die Geschwindigkeit muss also bei $0,3 \text{ m/s}$ liegen. Um die Probe zu bewegen kann sie entweder durch eine Durchflusszelle gepumpt werden oder die gesamte Probenzelle wird bewegt. Eine Durchflusszelle ist wesentlich stabiler und liefert entsprechend rauscharme Ergebnisse,

benötigt aber wesentlich mehr Probenmenge, da die Pumpe und Schläuche zu füllen sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher beide Ansätze realisiert.

Die beiden Küvettenhalterungen sowie eine Justagelehre sind in Abbildung 3.7(a) gezeigt. Alle Einheiten sind auf einer Grundplatte montiert, die mit Hilfe von Passstiften präzise zwischen den beiden Parabolspiegeln (PS1 in Abb. 3.6) ausgerichtet und mit zwei Inbusschrauben befestigt werden. Dafür sind die Parabolspiegel fest an eine Grundplatte montiert, die ebenfalls ein Raster präzise gesetzter Bohrungen aufweist (Abb. 3.7(b)). Die Justagelehre besitzt eine Bohrung von etwa 0,5 mm Durchmesser, mit der sich der optimale Strahlengang des Anregungs- und Abtastlichts am Probenort vorjustieren lässt.

Durchflusszelle

Die Grundkonstruktion der Durchflussküvette folgt dem Design von Bredenbeck und Hamm [129] und ist dort ausführlich beschrieben. Im Detail wurden am Design jedoch einige entscheidende Verbesserungen vorgenommen, die die Arbeit erheblich erleichtern und den schnellen und einfachen Tausch gegen andere Küvetten oder Justagelehren ermöglichen – ohne die Notwendigkeit einer Justage.

Im Wesentlichen besteht die Probenzelle aus zwei Kalziumfluoridfenstern, die durch eine Folie aus PTFE³⁵ getrennt sind, in die der Strömungskanal eingeschnitten ist. Eine der Scheiben ist zur Durchleitung der Probe mit zwei Bohrungen von 1,5 mm Durchmesser versehen. Vor- und Rücklauf bestehen aus PTFE-Schläuchen mit 1 mm Innendurchmesser, die am Ende aufgeweitet wurden. Die Abdichtung der Schlauchenden gegen die durchbohrte Scheibe erfolgt über O-Ringe aus Chemraz mit 1,42 mm Innendurchmesser und 1,52 mm Schnurstärke (Greene Tweed, Hofheim am Taunus). Die gesamte Konstruktion ist in ein Messinggehäuse untergebracht, allein der Anpressdruck durch den aufgeschraubten Deckel genügt zur Abdichtung, wobei zwei 100 µm dicke PTFE-Folien eine Beschädigung der Scheiben verhindern. Die Küvette ist in Abbildung 3.8 in verschiedenen Ansichten abgebildet.

Im Vergleich zu der veröffentlichten Konstruktion [129] wurden einige praktische Verbesserungen vorgenommen: Die Befestigung erfolgt an einer präzise einstellbaren *xyz*-Einheit die eine hohe Stabilität gewährleistet (vgl. Abb. 3.7(a)). Diese wird auf der bereits beschriebenen Grundplatte befestigt und lässt sich sehr einfach einsetzen und ausrichten. Die Befestigung der Küvette erfolgt nun durch das Einführen der runden Anformung in die Aussparung des Verschiebetisches und dem Anziehen von zwei bis vier gut zugänglichen Inbusschrauben. Man benötigt nur einen Inbusschraubendreher und weniger als eine Minute zum Austausch der Probenzelle gegen eine andere – beispielsweise eine Blende zum Justieren oder ein Halbleitersubstrat zum Einstellen des Zeitnullpunktes. Die Halterung verbleibt in der Anlage und erlaubt wegen des präzisen Anschlags das Messen unter identischen Bedingungen. Die Schläuche werden durch Nuten im Verschiebetisch nach vorne geführt, deswegen kann der Probenkreislauf beim Küvettenwechsel geschlossen bleiben und Schläuche brauchen nicht durch die Öffnung gefädelt werden. Die Ausfräsung

³⁵Polytetrafluorethylen, bekannt unter dem Markennamen *Teflon*

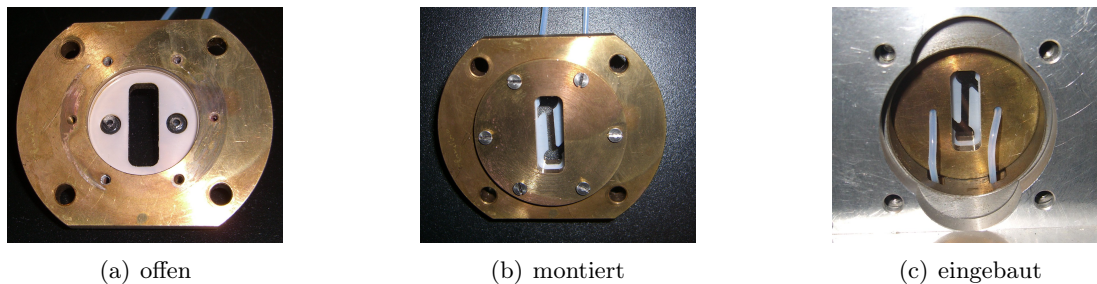


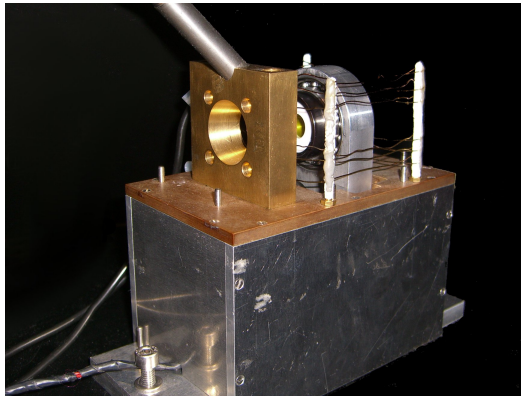
Abbildung 3.8: Detailansicht der Durchflusszelle. In (a) erkennt man gut die hintere, durchbohrte CaF₂-Scheibe und die darunterliegenden O-Ringe. (b) zeigt die vollständig montierte Küvette und (c) die in der Halterung eingebaute Einheit. Man beachte die runde Gehäuseanformung, die durch die Aussparung des Verschiebetisches geführt wird sowie die Nuten zur Führung der Schläuche auf die Vorderseite.

für die CaF₂-Scheiben ist vertieft und der Messingdeckel besitzt eine entsprechende Anformung, was den Zusammenbau der Einheit erheblich vereinfacht, da die schützende letzte Folie nun nicht mehr an den Kanten eingeklemmt werden kann.

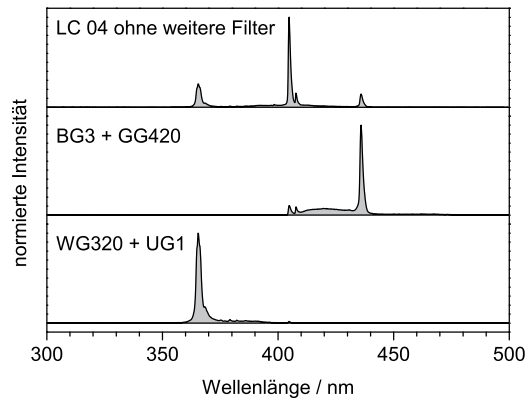
Die beiden äußeren Folien sind 100 μm dick, die mittlere ist in den Stärken 50 μm , 100 μm und 200 μm vorhanden, der Strömungskanal ist stets 2 mm breit. Die Folien wurden bereits in der richtigen Form bezogen, der Zuschnitt erfolgte durch Wasserstrahl-schneiden (Karl Späh, Scheer). Für 100 μm ergibt sich aus den geforderten 0,3 m/s Probenvorschub und der Querschnittsfläche von 0,2 mm² ein Volumenstrom von mindestens 60 $\mu\text{l/s}$ bzw. 3,6 ml/min, was leicht realisierbar ist. Als Pumpe diente eine Peristaltikpumpe mit einem Masterflex Pumpenkopf für PTFE Pumpenschläuche (Cole-Parmer, Illinois, USA) und es wurde ausschließlich PTFE als Schlauchmaterial eingesetzt. Das minimale Probenkreisvolumen liegt bei 1 ml, was in erster Linie durch den Pumpenschlauch und die langen Verbindungsleitungen bestimmt wird.

Rotationsküvette

Die entwickelte Rotationsküvette besticht durch ihre einfache Handhabung und den sehr kompakten aber stabilen Aufbau. Besonders hervorzuheben ist, dass die verwendeten Probenzellen einen Küvettenwechsel mit wenigen Handgriffen und ohne Werkzeug ermöglichen. Dabei ist eine hervorragende Vergleichbarkeit jederzeit gegeben. Die Mechanik mit der montierten Küvette ist in Abbildung 3.7(a) in der Mitte abgebildet. Die Probenkammer selbst besteht aus zwei Kalziumfluoridscheiben und einem 50 μm starken PTFE-Ring mit 25 mm Außen- und 19 mm Innendurchmesser (Karl Späh, Scheer). Das Gehäuse bildet eine kommerzielle Linsenhalterung (SM1L03, Thorlabs, Karlsfeld), wobei der Gewinding zum Zusammenpressen der Scheiben und damit zum Abdichten verwendet wird. Die Probenzelle wird über das ebenfalls vorhandene Außengewinde direkt in die kugelgelagerte Röhre der Rotationseinheit eingeschraubt, die über einem Riemenantrieb von einem kleinen Elektromotor gedreht wird.



(a) Rotationsküvette mit Faseranschluss der Belichtungseinheit und Heizwendeln



(b) Spektren der UV-Belichtungseinheit

Abbildung 3.9: (a) Belichtungseinheit der Rotationsküvette mit dem Heizwendeln zur elektrischen Beheizung aber ohne die Isolierkammer. In (b) sind die Spektren der UV-Lampe bzw. der UV-Lampe mit den verwendeten Filterkombinationen dargestellt.

Eine zusätzliche Translationsbewegung dieser Baugruppe wird durch ein Linearlager ermöglicht. Der Antrieb erfolgt mit einem direkt am Elektromotor angebrachten Exzenter über eine Pleuelstange. Ein verschiebbarer und in jeder Position arretierbarer Nutenstein erlaubt einen beliebig einstellbaren Hub und ein mit Langlöchern befestigtes Gegenlager die freie Wahl des Umkehrpunktes. Bei einer typischen Einstellung wird die Probe innerhalb eines Kreisringes mit einem Innendurchmesser von > 8 mm angeregt. Der geforderte Probenvorschub von $0,3$ m/s entspricht dann einer Rotationsgeschwindigkeit von 12 Umdrehungen pro Sekunde oder 720 pro Minute, was leicht erreicht werden kann.

Probenbelichtung

Einige Proben erfordern eine kontinuierliche Belichtung während der zeitaufgelösten Messung zur Herstellung und Erhaltung eines photostationären Gleichgewichtszustands. Insbesondere bei geringen Probenmengen und langer Messdauer kann sonst die Verschiebung der Gleichgewichtslage durch das Anregungslicht nicht vernachlässigt werden. Die hier entwickelte Probenkammer erlaubt die permanente und gleichmäßige Beleuchtung der gesamten Probe während der Messung über einen Lichtleiter.

Hier wurde als Lichtquelle eine UV-Lampe des Typs LC 04 (Hamamatsu, Herrsching) mit einem Quarzglaslichtleiter mit 5 mm Durchmesser verwendet. Das aus der Faser emittierte Licht wird über eine Linse in einen zweiten, identischen Lichtleiter eingekoppelt und durch eine Kombination aus Farbglas- und ND-Filtern spektral gefiltert bzw. in der Intensität angepasst. Die Filterhalterung ist als Wasserbad ausgelegt, was die thermische Spannung in den Filtergläsern verringert und so einem Defekt der Optiken vorbeugt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich eine Quecksilber-Xenon-Dampfampe als

Leuchtmittel eingesetzt, die Spektren mit und ohne die verwendeten Filterkombinationen werden in Abbildung 3.9(b) dargestellt.

Die Beleuchtung der Probe erfolgt direkt mit dem divergierenden Lichtbündel am Faserausgang ohne weitere Optiken. Zur Positionierung der Faser dient eine Halterung, die auf die Grundplatte der Küvetteneinheit aufgesteckt und durch Stifte exakt ausgerichtet wird (Abb. 3.9). Das Faserende wird in den Messingblock gesteckt und beleuchtet die Probenzelle schräg von oben. So ist eine absolut gleichmäßige Ausleuchtung der Probe bei ungehindertem Strahlengang von Anreg- und Abtast- bzw. Referenzlicht gewährleistet. Die Steckmontage ermöglicht den schnellen Ein- und Ausbau der gesamten Einheit ohne zusätzliche Werkzeuge, so dass der Küvettenwechsel immer noch sehr einfach bleibt.

Probentemperierung

Um die transienten Infrarotspektren bei unterschiedlichen Temperaturen messen zu können, wurde sowohl für die Durchfluss- als auch für die Rotationszelle eine Möglichkeit zur Beheizung geschaffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die temperierbare Rotationsküvette eingesetzt.

Eine direkte Beheizung der Probenzelle ist hier aus verschiedenen Gründen unmöglich, es sollen einige Schwierigkeiten angeführt werden: wegen der metallischen Kontaktstellen würde ein großer Teil der Wärme über das Kugellager abgeleitet werden, eine homogene Temperaturverteilung in der Probenkammer ist nicht zu gewährleisten, die volle Rotationsgeschwindigkeit muss bei Beheizung erhalten bleiben.

Bei der hier gewählten Lösung wird die Küvette von einer isolierten Temperkammer aus 1 cm dickem, aluminiumkaschiertem Polyurethanschaum umschlossen, die Öffnungen für Anreg- und Abtaststrahlengang sowie den Faseranschluss der Belichtungseinheit besitzt. Deren Inneres wird elektrisch mit einem aufgewickelten Widerstandsdraht beheizt (Abb. 3.9(a)). Durch die Erwärmung des gesamten eingeschlossenen Luftvolumens innerhalb der Kammer wird ein Temperaturgradient innerhalb der Probenzelle vermieden. Der thermische Kontakt von optischem Tisch und Küvettenhalterung wird durch Kunststoffdistanzstücke minimiert. Die Heizleistung ist über ein regelbares Netzteil stufenlos einstellbar und die erreichte Temperatur wird innerhalb der Kammer durch ein Thermoelement im Messingblock der Belichtungseinheit bestimmt.

Um den erforderlichen Platz für die Isolierung zu schaffen, muss die Strahlführung modifiziert werden. Die Grundplatte mit den Parabolspiegeln (PS1 in Abb. 3.6) wird so angeordnet, dass das Abtastlicht die Paraboloiden an den Rändern trifft und die ein- und auslaufenden Strahlen möglichst weit voneinander separiert sind. Das Anregungslicht wird seitlich an dem Parabolspiegel vorbeigeführt. Die Küvetteneinheit muss ebenfalls etwas verdreht werden, die Ausrichtung ist ein Kompromiss aus dem Platzbedarf für die Isolierung der Temperkammer und dem optimalen Winkel zu Anreg- und Abtaststrahl von 90°.

Mittels einer Küvette mit einem durchbohrten CaF₂-Fenster konnte die Temperatur bei Testmessungen direkt in der Probenzelle bestimmt und mit der im Messingblock korreliert werden. So konnte für jede Solltemperatur der Probe zunächst die korrespondie-

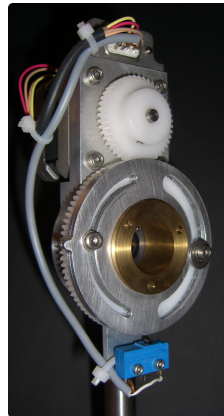


Abbildung 3.10: Computergesteuerte Rotationseinheit zur Polarisationskontrolle. Gut sichtbar sind der oben angeflanschte Schrittmotor mit den Antriebszahnradern sowie die Nocke (links) und der Mikroschalter zur Referenzierung der Position. Die eingebaute Verzögerungsplatte ist hinter dem Messingdrehteil zu erkennen.

rende im Messingblock sowie die optimale Heizleistung bestimmt werden. Vor Beginn der Messung musste zunächst die Einstellung eines thermischen Gleichgewichtes abgewartet und evtl. der Strahlengang im Bereich der Probenkammer erneut optimiert werden. Der stationäre Zustand wurde nach etwa einer Stunde erreicht und mit Hilfe eines Folientemperaturfühlers (Pt 100) zwischen der Grundplatte mit den Parabolspiegeln und dem optischen Tisch verifiziert. Die Aufheizung der Luft außerhalb der Temperkammer kann vernachlässigt werden, da die gesamte Apparatur permanent mit getrockneter Luft bei Raumtemperatur gespült wird und so kein Wärmestau entsteht. Die Dichteschwankungen der erwärmten Luft führen zu Richtungsschwankungen von Anreg- und Abtaststrahl, es zeigt sich jedoch in den Messergebnissen, dass sich keine signifikante Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ergibt.

Die Temperierung einer Durchflusszelle inklusive der Vor- und Rücklaufschläuche für die Probe wurde bereits von Bredenbeck demonstriert [130], derselbe Ansatz wurde hier verwendet. Das Gehäuse der Küvetten wurde modifiziert: es besitzt eine größere Materialstärke und ist mit Kanälen versehen, die eine Beheizung mittels eines Umlaufthermostaten ermöglichen. Auf der Rückseite dient ein Kunststoffdrehteil zwischen Gehäuse und dem Verschiebetisch als thermische Isolierung. Die Konstruktion wurde so abgeändert, dass sich dieselbe Position der CaF_2 -Scheiben relativ zum Anschlag ergibt, wie bei den unmodifizierten Küvetten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sie jedoch nicht mehr eingesetzt, weshalb auf weitere Details verzichtet wird.

Polarisationskontrolle

Zur Messung von Anisotropieinformationen (vgl. Abschnitt 3.2.3, ab S. 60) ist eine Messung mit verschiedenen relativen Orientierungen der Polarisations Ebenen von Anreg- und Abtastpuls notwendig. Ein automatischer, wiederholter Wechsel der Orientierungen

während der Messung bietet die beste Vergleichbarkeit der Messwerte, da alle Messreihen unter ansonsten identischen Bedingungen aufgenommen werden.

Deshalb wurde eine computergesteuerte Rotationshalterung entwickelt, die ein schnelles und präzises Ausrichten einer $\lambda/2$ -Verzögerungsplatte ermöglicht (Abb. 3.10). Diese ist aufgrund der kompakten Bauweise leicht in den optischen Aufbau zu integrieren und erlaubt auf komfortable Weise die programmgesteuerte Einstellung beliebiger Polarisierungen. In dieser Arbeit wurden achromatische Verzögerungsplatten mit Luftspalt für die Bereiche 300 nm bis 470 nm und 460 nm bis 680 nm (B. Halle Nachfl., Berlin) eingesetzt.

Ein Schrittmotor MS 019 HT (Isel, Eiterfeld) mit einem Schrittwinkel von $1,8^\circ$ treibt über ein 1:2 untersetztes Zahnradgetriebe direkt die kugelgelagerte Optikhalterung an. Die Ansteuerung erfolgt über eine LS-146 Schrittmotorsteuerung (Logosol, Sunnyvale, USA) im Mikroschrittbetrieb. Damit liegt die Winkelauflösung theoretisch bei $0,1125^\circ$ (3200 Schritte pro Umdrehung), sie wird also allein durch das Getriebeispiel bestimmt. Die Steuerung verfügt über Eingänge für Referenz- und Endlagenschalter. Eine Nockenscheibe und ein Mikroschalter ermöglichen somit das exakte Anfahren einer Referenzposition. Dabei wird der Schaltzeitpunkt stets mit dem nächsten Vollschritt identifiziert, um Ungenauigkeiten zu minimieren.

Die gesamte Steuerung und Kalibrierung ist in das Messprogramm (Abschnitt 3.2, ab S. 51) integriert, wichtige Einstellungen wie Motorströme und Taktraten sind in der Parameterdatei abgespeichert. Mit Hilfe eines Polarisators werden die Polarisationszustände *parallel* und *senkrecht* eingestellt und die Motorpositionen werden als Parameter gespeichert. Für die Messung beliebiger Winkel sind diese nur noch im Programm einzugeben, die zugehörigen Motorpositionen werden automatisch aus den hinterlegten Werten interpoliert.

Um Störungen der Messung durch den mit 20 kHz modulierten Motorstrom oder die Steuerung selbst zu minimieren, wird die Verstärkerstufe nach dem Erreichen der korrekten Position und vor der Aufnahme von Daten stets abgeschaltet. Trotz dieser Ab- und Einschaltvorgänge erfolgt das Umschalten zwischen *parallel* und *senkrecht* sehr schnell (<1 s). Vor jeder Messreihe wird außerdem einmal die Referenzposition angefahren um die Akkumulation von Schrittfehlern zu vermeiden.

3.1.5 Eliminierung von Störgrößen

Entscheidend für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messungen ist die reproduzierbare Erzeugung der Abtastpulse und deren rauscharme Detektion. In der Entwicklung und Optimierung des experimentellen Aufbaus wurden zahlreiche Ursachen für Instabilitäten identifiziert und eliminiert, um die experimentelle Auflösung bei vorgegebener Messdauer zu erhöhen.

Dabei ist hervorzuheben, dass sich die Zeitskalen, auf der sich Störungen auswirken, entsprechend ihrer Ursache unterscheiden. Abweichungen auf der Millisekundenzeitskala oder einzelner Abtastpulse entstehen beispielsweise in der IR-Erzeugung (suboptimale Justage, Leistungs- oder Richtungsschwankungen des Lasers, Vibrationen des optischen Tisches) in der Detektion (elektromagnetische Pulse, Spannungsspitzen im Netz) oder

durch die Bewegung der Probe (Luftblasen, Schwebeteilchen). Drifts im Bereich von einigen hundert Millisekunden können durch Instabilitäten des Lasersystems und der nichtlinearen optischen Prozesse, Bewegungen der Probe/Küvette (Keilwinkel in den Fenstern, Probeninhomogenitäten) verursacht werden. Sehr langsame Änderungen in den detektierten Pulsspektren ergeben sich vor allem durch Temperaturschwankungen im Labor oder in den Kühlwasserkreisläufen des Lasers. Ein Teil der Probleme kann mit technischen Maßnahmen behoben werden, andere Störungen lassen sich durch die Filterung der gemessenen Daten nachträglich korrigieren. Im Folgenden werden zwei Beispiele für große Intensitätsschwankungen und die Methoden zu ihrer Behebung vorgestellt

Temperaturschwankungen

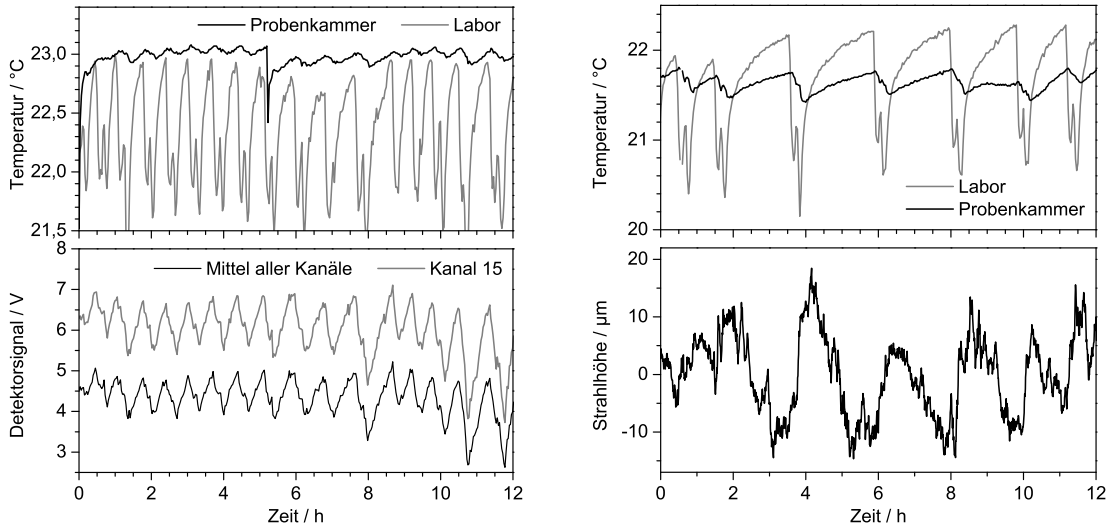
In Abbildung 3.11(a) wird gezeigt, welchen Einfluss die Schwankungen der Labor-temperatur auf die gemittelte Infrarotintensität haben. Ursache für die regelmäßigen Temperaturänderungen ist die sehr leistungsfähige Klimatisierung des Labors: es sind zwei Innengeräte mit einer Kühlleistung von jeweils 2,5 kW verbaut, deren Regelung den Betrieb zwischen etwa 10 % und 100 % der Nennleistung gestattet. Liegt im Labor keine entsprechende Heizlast vor, dann schalten sich beide Aggregate ab ($T < 22^\circ\text{C}$), die Temperatur steigt und führt zu einem zeitverzögerten Einschalten beider Geräte ($T \approx 22^\circ\text{C}$). Nach der schnellen Abkühlung des Labores schalten diese wieder ab und eine Regelung der Kühlleistung erfolgt nicht.

Offensichtlich korreliert die mittlere IR-Intensität über den gesamten Zeitraum dieser Messung von über 12 h mit diesen Temperaturänderungen. Eine direkte Beeinflussung der nichtlinearen optischen Prozesse kann allerdings ausgeschlossen werden: der gesamte optische Tisch ist mit Kunststoffplatten abgedeckt und so teilweise isoliert, die Schwankungen liegen hier nur noch im Bereich von $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Als Ursache wurden Verwindungen des optischen Tisches identifiziert, die sich aus den unterschiedlichen Temperaturen der isolierten Ober- und der ungeschützten Unterseite ergaben. Die unterschiedliche Wärmeausdehnung konnte mit Hilfe eines LM 10 Quadrantenmesskopfes zusammen mit einem Messgerät vom Typ Fieldmaster (Coherent, Dieburg) anhand der ebenfalls temperaturabhängigen Strahlrichtungsschwankung der Laserfundamentale nachgewiesen werden (Abb. 3.11).

Um die Probleme durch die Klimatisierung zu beseitigen wurden folgende Maßnahmen ergriffen:

- Alle Wärmequellen wie Thermostate, Netzteile oder andere elektrische Verbraucher wurden unter dem optischen Tisch bzw. aus dessen Nähe entfernt.
- Die Steuerung für beide Innengeräte der Klimaanlage wurde entkoppelt, bei geringerem Kühlleistungsbedarf kann eines abgeschaltet werden. Temperaturschwankungen erfolgen langsamer und der Regelbereich des aktiven Aggregates wird ausgenutzt.
- Der optische Tisch wurde seitlich mit Folien abgehängt. Mit dieser Isolierung werden Temperaturänderungen auch auf der Unterseite abgeschwächt.



(a) Labortemperatur und detektierte MIR-Intensität

(b) Labortemperatur und Laserstrahlposition

Abbildung 3.11: (a) Schwankungen der Labortemperatur haben einen direkten Einfluss auf die IR-Erzeugung; die zwei benachbarten Minima entstehen durch das zeitverzögerte Einschalten beider Klimaanlage, die Außentemperaturen bestimmen wesentlich den Einschaltzyklus. Das Befüllen des Detektors mit flüssigem Stickstoff am Beginn der Messung und nach ca. $5\frac{1}{4}$ h zeigt keinen Effekt.

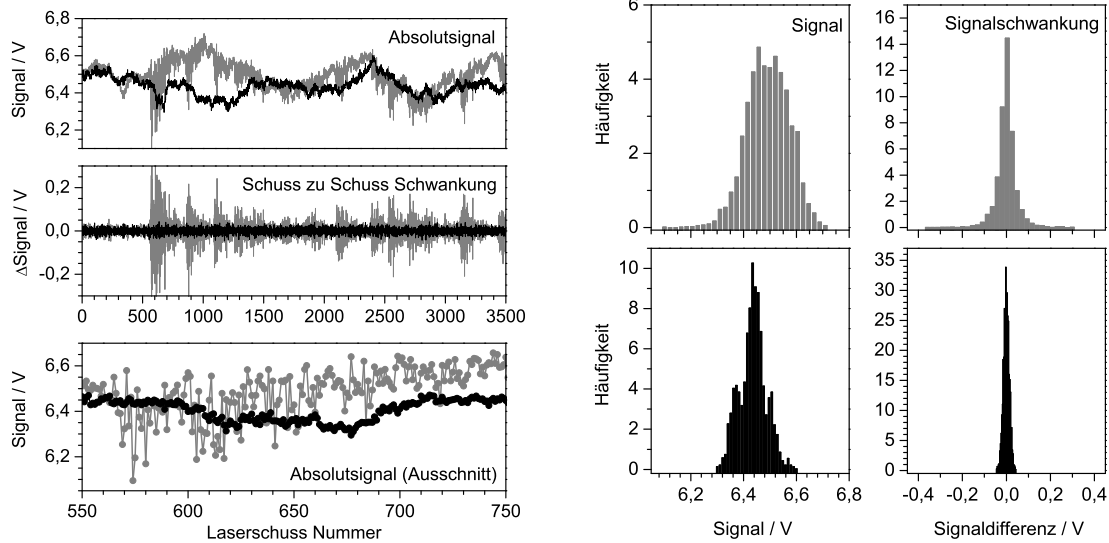
(b) Ursache sind Strahlrichtungsschwankungen des Lasers aufgrund einer Verwindung des optischen Tisches durch die unterschiedlichen Temperaturen auf seiner Ober- und Unterseite.

Diese sehr einfachen Lösungen haben sich als erfolgreich erwiesen, die jetzt noch auftretenden Langzeitdrifts sind weitgehend von der Labortemperatur entkoppelt. Die Anschaffung oder der Bau einer Einheit zur aktiven Stabilisierung von Strahl Lage und -Position könnte in Zukunft noch weitere Verbesserungen bringen.

Vibrationen

Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis für zwei Messungen der Intensität von jeweils 3500 aufeinander folgenden MIR-Pulsen – ohne Probe. Bei einer der Messungen (grau) wurden zusätzlich durch Klopfen auf den optischen Tisch Instabilitäten eingeführt, was an der ab Puls Nr. 550 deutlich gestiegenen Schwankung zu erkennen ist. Die mit diesen Vibrationen verbundenen Schwingungen der optischen Elemente erzeugen geringe Strahlrichtungsschwankungen, die wegen der nichtlinearen Prozesse zu erheblichen Instabilitäten führen.

In der Darstellung der Puls-zu-Puls-Abweichung ($(\Delta I)_i = I_{i+1} - I_i$) ist zu erkennen, dass die Vibrationen die hohe Korrelation in der Intensität aufeinanderfolgender Schüsse zerstört. Dabei wird die Verteilung der Werte selbst (Abb. 3.12(b), linke Graphen) durch die in beiden Messreihen zusätzlich vorhandene, langsamere Modulation bestimmt und lässt alleine keinen eindeutigen Schluss auf die Ursache der Störung zu. Die verursachten



(a) IR-Signal, zwei Messungen, jeweils 3500 Pulse

(b) Histogramme der zwei Messreihen

Abbildung 3.12: Zwei Messungen des MIR-Signals von 3500 Laserschüssen wurden unter identischen Einstellungen aufgenommen, während einer Messreihe (grau) wurde leicht auf den optischen Tisch geklopft (a). Die verursachten Störungen (etwa ab Schuss Nr. 550) sind besonders in der Schuss zu Schuss Abweichung zu erkennen. In (b) sind die Verteilungen der MIR-Signale und ihrer Schuss zu Schuss Abweichung aufgetragen, die Verteilung der Abweichung für die gestörte Messung ist stark verbreitert.

Puls-zu-Puls-Abweichungen lassen sich am besten in den Flanken der zugehörigen Histogramme (Abb. 3.12(b), rechte Graphen) identifizieren.

Um derartige Störungen zu vermeiden, werden Geräte mit beweglichen Teilen möglichst nicht auf dem optischen Tisch untergebracht (z. B. die Peristaltikpumpe) oder durch Gummipuffer schwingungs isoliert (z. B. das Unterbrecherrad). Alle Vibrationen lassen sich jedoch nicht vermeiden, da das Gebäude sie selbst bei entfernten Quellen in das optische System überträgt. Deshalb wurden als weitere Maßnahme die bisher ungenutzte Schwingungs isolierung des optischen Tisches in Betrieb genommen: Die vorhandenen Füße der I2000 Serie (Newport, Darmstadt) entkoppeln den optischen Tisch durch luftgelagerte Kolben in allen drei Raumrichtungen vom Untergrund, wirken als Schwingungsdämpfer und stellen über pneumatische Steuerventile eine automatische Niveauregulierung zur Verfügung. Um einen komfortablen und sicheren Dauerbetrieb in Zukunft zu gewährleisten, wurde im Labor eine entsprechende Druckluftversorgung inklusive Kondensatabscheider, Filterkombination und Druckminderer installiert.

3.2 Das Messprogramm

Zusammen mit dem experimentellen Aufbau wurde ein umfangreiches Softwarepaket in der Programmiersprache LabVIEW 7.1 (National Instruments, München) entwickelt, das

die Kontrolle sämtlicher computergesteuerter Komponenten sowie die Datenerfassung und -vorverarbeitung ermöglicht. Der Funktionsumfang geht weit über die Ablaufsteuerung einer Messung hinaus, zahlreiche Unterprogramme dienen der Optimierung der optischen Prozesse oder der Wahl der Parameter für die anstehende Messung. Im Folgenden wird insbesondere auf die Datenerfassung und -vorverarbeitung sowie die während einer Messung ablaufenden Prozesse näher eingegangen.

3.2.1 Funktionsumfang

Eine detaillierte Beschreibung der Programmstruktur würde den Umfang dieser Arbeit sprengen, daher wird nur ein kurzer Überblick über die bereitgestellten Funktionen gegeben.

- Einstellung aller relevanten Parameter, wie beispielsweise:
 - Spektrometer: Auswahl von Spaltbreite, Gitter und Wellenlänge
 - ADC: Integrationsdauer und -verzögerung, Anzahl der aufzunehmenden Laserschüsse, Zuordnung der Detektorzeilen als Signal und Referenz
 - Verschiebetisch: Nullpunktseinstellung, Vorgabe der Zeitpunkte bzw. Positionen
 - Vorgabe der zu messenden Polarisationszustände
 - Datenverarbeitung: Festlegen von Schwellwerten
 - Datenspeicherung: Zielverzeichnis, Auswahl der zu speichernden Dateien (referenzierte und/oder unreferenzierte Messung, Anlegen einer Protokolldatei), Kommentare in den Datensätzen
 - Festlegen von Schnittstellen und Kommunikationsparametern
- Hilfsprogramme zum Optimieren der experimentellen Einstellungen
 - Anzeige des Spektrums der MIR-Abtastpulse auf beiden Detektorzeilen zur Optimierung der IR-Erzeugung und der Einkopplung in das Spektrometer
 - Anzeige der Intensität einer frei wählbaren Anzahl aufeinander folgender Laserschüsse und deren Standard- bzw. Schuss-zu-Schuss-Abweichung zur Optimierung der IR-Erzeugung in Hinblick auf Stabilität
 - Einstellung der verwendeten Schwellwerte und Darstellung ihrer Wirkung (vgl. S. 55)
- Hilfsprogramme zur Einstellung nicht frei wählbarer Parameter
 - Zuordnung eines Detektorkanals zur eingestellten Wellenlänge (Kalibrierung)
 - Suchen des zeitlichen Überlapps von Anreg- und Abtastpulsen, Festlegen des Nullpunktes des Verschiebetisches

- Einstellung der Schrittmotorpositionen der Rotationshalterung für parallele und senkrechte Orientierung der Polarisation von Anreg- und Abtastlicht
- Programme zum Erleichtern der Bedienbarkeit
 - Erstellung einer Zeitskala als stetig differenzierbare Zusammensetzung von linear und exponentiell anwachsenden Schritten, Berechnung der zugehörigen Verschiebetischpositionen, Validierung der erhaltenen Werte in Hinblick auf die Grenzen des Verfahrbereiches
 - Automatische Vergabe von Dateinamen für jede gestartete Messung aus dem Datum bei Start der Messung und fortlaufender alphabetischer Indizierung und Erweiterung des Namens für referenziert/unreferenziert sowie den Polarisationszustand.
- Wählbare Speicherung der gemittelten Signale aller Kanäle in einer Protokolldatei zur Validierung der Messergebnisse und Erleichterung der Fehlersuche.

Alle in der Software einstellbaren Werte werden in einer globalen Variablen abgelegt und bei Änderungen in einer Parameterdatei auf der Festplatte gespeichert. Beim Programmstart werden alle Parameter mit den gespeicherten Werten initialisiert, so dass die Einstellungen der letzten Messung automatisch zur Verfügung stehen.

3.2.2 Datenerfassung und -verarbeitung

Das Prinzip der transienten Absorptionsspektroskopie wurde bereits in Abschnitt 2.5.1 erläutert. Nach Gleichung 2.10 auf S. 14 genügt es für jede Verzögerungszeit t jeweils die Spektren der Abtastpulse $I^*(\tilde{\nu}, t)$ mit und $I(\tilde{\nu})$ ohne Anregung der Probe zu bestimmen. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass in der Praxis erst die Mittelung über viele Einzelmessungen die erforderliche Sensitivität liefert.

Mit den beiden Detektorzeilen ist eine referenzierte Messung möglich: der MIR-Puls wird am Strahlteiler ST1 (in Abb. 3.6, S. 38) in zwei etwa gleichstarke Reflexe aufgeteilt. Einer dient als Abtastpuls (I_{sig}), wird über die Umwegstrecke geschickt und in der Probe räumlich mit dem Anregungslicht überlagert. Der andere dient als Referenz (I_{ref}), er wird nicht verzögert sondern räumlich (≈ 2 mm) und zeitlich getrennt vom Anregungslicht in die Probe fokussiert. Da beide Repliken aus demselben Puls stammen kann eine referenzierte Messung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessern, falls Instabilitäten der erzeugten Infrarotpulse eine wesentliche Rauschquelle darstellen. Die prinzipielle Verarbeitung der Messwerte wird im Folgenden kurz wiedergegeben.

Vor jeder Messreihe wird mit einem computergesteuerten Verschluss das gesamte Licht abgeblockt und ein gemittelt Hintergrundsignal $\langle I^{\text{H}} \rangle$ für alle Detektorelemente über eine gerade Anzahl von $2n$ Laserschüssen gemessen:

$$\langle I^{\text{H}} \rangle = \frac{1}{2n} \sum_{i=1}^{2n} I_i^{\text{H}} \quad (3.4)$$

Für die Messung der Absorptionsänderung bei einer Verzögerungszeit t werden nun $2n$ Spektren der Signal- und Referenzpulse eingelesen. Mittels einer Photodiode, die das Streulicht hinter dem Unterbrecherrad detektiert und deren Signal über einen externen Eingang des Integratorsystems zur Verfügung steht, erfolgt die Zuordnung der detektierten Spektren zu den Messungen *mit* und *ohne* Anregungslicht. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit möge bei den geraden Laserschüssen ($2i$) das Anregungslicht geblockt sein, dann erhält man die gemittelten Intensitäten als:

$$\langle I_{\text{sig}}^*(\tilde{\nu}, t) \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{\text{sig},2i-1}^*(\tilde{\nu}, t) - \langle I_{\text{sig}}^{\text{H}}(\tilde{\nu}) \rangle \quad (3.5)$$

$$\langle I_{\text{sig}}(\tilde{\nu}) \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{\text{sig},2i}(\tilde{\nu}) - \langle I_{\text{sig}}^{\text{H}}(\tilde{\nu}) \rangle \quad (3.6)$$

$$\langle I_{\text{ref}}^*(\tilde{\nu}, t) \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{\text{ref},2i-1}^*(\tilde{\nu}, t) - \langle I_{\text{ref}}^{\text{H}}(\tilde{\nu}) \rangle \quad (3.7)$$

$$\langle I_{\text{ref}}(\tilde{\nu}) \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{\text{ref},2i}(\tilde{\nu}) - \langle I_{\text{ref}}^{\text{H}}(\tilde{\nu}) \rangle \quad (3.8)$$

Daraus kann nun die Absorptionsänderung für diese gemittelten Werte der Messung mit oder ohne Einbeziehung der Referenzspektren berechnet werden:

$$\Delta A_{\text{ref}}(\tilde{\nu}, t) = -\log_{10} \left(\frac{\langle I_{\text{sig}}^*(\tilde{\nu}, t) \rangle \langle I_{\text{ref}}(\tilde{\nu}) \rangle}{\langle I_{\text{sig}}(\tilde{\nu}) \rangle \langle I_{\text{ref}}^*(\tilde{\nu}, t) \rangle} \right) \quad (3.9)$$

$$\Delta A_{\text{unref}}(\tilde{\nu}, t) = -\log_{10} \left(\frac{\langle I_{\text{sig}}^*(\tilde{\nu}, t) \rangle}{\langle I_{\text{sig}}(\tilde{\nu}) \rangle} \right) \quad (3.10)$$

Die Berechnung der Absorptionsänderung aus den über viele Schüsse gemittelten Intensitäten ist unter den folgenden Annahmen zulässig:

1. Es wird davon ausgegangen, dass jede Einzelmessung stets dieselbe relative Transmission ergibt ($T_i = I_{2i-1}^*/I_{2i}$) und dass Abweichungen rein statistischer Natur sind.
2. Langsame Veränderungen der Pulsintensitäten entsprechen einem Vorfaktor c_i , der für zwei aufeinanderfolgende Pulse identisch ist und sich bei Division folglich kürzt. Mit $I_{2i-1}^* = c_i \tilde{I}^*$ und $I_{2i} = c_i \tilde{I}$ ergibt sich

$$\begin{aligned} \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{2i-1}^*}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{2i}} &= \frac{\sum_{i=1}^n c_i \tilde{I}^*}{\sum_{i=1}^n c_i \tilde{I}} = \frac{\tilde{I}^* \sum_{i=1}^n c_i}{\tilde{I} \sum_{i=1}^n c_i} = \frac{\tilde{I}^*}{\tilde{I}} \\ &= \frac{\tilde{I}^*}{\tilde{I}} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{c_i}{c_i} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{c_i \tilde{I}^*}{c_i \tilde{I}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{I_{2i-1}^*}{I_{2i}} \end{aligned} \quad (3.11)$$

3. Die Auswirkungen kleiner statistischer Abweichungen in den Intensitäten zweier aufeinander folgender Pulse lassen sich mit Gaußscher Fehlerrechnung abschätzen. Der Fehler der relativen Transmission ist proportional zu den relativen Fehlern der Intensitäten: Damit gilt für die Einzelmessung:

$$\frac{\Delta T_i}{T_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta I_i^*}{I_i^*}\right)^2 + \left(\frac{\Delta I_i}{I_i}\right)^2} \quad (3.12)$$

Bei Mittelung der Intensitäten über n Pulse ist der Fehler für den Mittelwert um den Faktor $1/\sqrt{n}$ geringer als der Fehler der Einzelmessung. Wegen der Linearität (Gl. 3.12) verringert sich der Fehler für die aus den Mittelwerten errechnete relative Transmission entsprechend. Bildet man den Mittelwert der Einzelmessungen ($\langle T \rangle = 1/n \sum_{i=1}^n T_i$), so erhält man dasselbe Ergebnis:

$$\Delta \langle T \rangle = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\sum_{i=1}^n (T_i - \langle T \rangle)^2} \quad (3.13)$$

Im Gültigkeitsbereich dieser Fehlerrechnung spielt es also keine Rolle, ob zunächst die relative Transmission der Einzelmessung berechnet und anschließend gemittelt wird oder umgekehrt erst die Intensitäten gemittelt werden.

Der Vorteil der Mittelung der Intensitäten zeigt sich, falls auf Kanälen mit geringer Lichtintensität sehr kleine Werte von I_i auftreten. Wegen der Division durch diese kleinen Zahlen würden die Schwankungen einzelner Werte zu großen Fehlern in der relativen Transmission führen, die durch die Mittelung nicht mehr kompensiert werden können. In diesem Szenario hätten die kleinsten Messwerte von I_i das größte statistische Gewicht.

Da langsam veränderliche Intensitäten der Abtastpulse keinen Einfluss auf das Messergebnis haben, kann eine referenzierte Messung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich verbessern, da so die Schwankungen der IR-Erzeugung eliminiert werden. Allerdings kann der ebenfalls durch die bewegte Probe geführte Referenzstrahl selbst die Ursache für zusätzliche Rauschbeiträge sein. Das Messprogramm erlaubt die Berechnung der relativen Transmission mit oder ohne Einbeziehung der Referenzwerte. Es kann gewählt werden, ob die referenzierten, die unreferenzierten oder beide Datensätze gespeichert werden sollen.

Filterung der Daten

Bereits in Abschnitt 3.1.5 wurde gezeigt, dass verschiedene Störquellen zu Instabilitäten auf ganz unterschiedlichen Zeitskalen führen. Während sich langsame Änderungen der Signalamplitude nicht auf die Messung der Absorptionsänderung auswirken, stellen erhöhte Puls-zu-Puls-Abweichungen ($(\Delta I)_i^{pp} = I_{i+1} - I_i$) ein Problem dar. Deshalb wurde eine digitale Filterung entwickelt, die die wirksame Erkennung von Ausreißern erlaubt und diese vor der Mittelung der Daten eliminiert. Die Prozedur geht über die

einfache Diskriminierung ungültiger Werte mit Hilfe fest vorgegebener Schranken hinaus: für die Analyse wird ausgenutzt, dass die Korrelation der IR-Intensität auf kurzen Zeitskalen – insbesondere von Puls zu Puls – allgemein wesentlich stärker ist als auf langen.

Der gesamte Prozess setzt sich aus mehreren Stufen zusammen. Zunächst werden alle Daten mit dem Wertebereich des ADC und mit beliebig wählbaren oberen und unteren Schranken auf ausgesuchten Kanäle verglichen. Insbesondere wird für jeden einzelnen Puls das Photodiodensignal des Anregungslichtes überprüft: ob also bei der Messung *mit* Anregung die gesetzte Schwelle über- bzw. bei der Messung *ohne* Anregung unterschritten wird. Nur solche Pulse werden weiterverarbeitet, bei denen alle Werte innerhalb der vorgegebenen Parameter liegen. Aufgrund der im System vorhandenen Langzeitdrifts müssen diese Schwellwerte jedoch großzügig gesetzt werden.

Um noch feiner abgestimmte Schwellwertbedingungen abzuleiten, werden die eingelesenen Daten im nächsten Schritt statistisch analysiert. Auf ausgesuchten Kanälen wird die Werteverteilung mittels eines Levenberg-Marquart-Algorithmus durch eine Gaußfunktion angepasst. Aus der Position und Breite dieser angepassten Funktion werden neue Schwellwerte errechnet, wobei die zulässige Breite in Einheiten der Standardabweichung angegeben wird. So passen sich die Schwellwerte flexibel an die aktuellen Bedingungen – mittlere Intensität und mittlere Schwankung – an. In Abbildung 3.13(a) ist ein Screenshot des Unterprogramms *SetRelLimits.vi* zur Einstellung dieser Schwellwerte gezeigt. Zu sehen ist die Verteilung der Werte mit angepasster Funktion sowie die abgeleiteten Schwellwerte als blaue Striche im Histogramm bzw. grüne in der Darstellung der einzelnen Pulse als Balkendiagramm. Der als roter Balken markierte Puls zeigt eine ungewöhnlich niedrige Intensität unterhalb der unteren Schranke und wurde deshalb aussortiert. Diese Prozedur wird nur für einige ausgesuchte Kanäle angewendet, da die erforderliche nichtlineare Kurvenanpassung ansonsten zu rechenintensiv wäre.

Die Korrelation der Intensitäten über wenige Pulse erlaubt eine noch engere Eingrenzung gültiger Werte: Es wird ein gleitendes Mittel über eine einstellbare Anzahl von Pulsen, sowie die mittlere quadratische Abweichung jedes Einzelwertes von diesem Mittel berechnet. Die obere und untere Schranke wird nun wieder in Einheiten dieser mittleren Abweichung angegeben und ergibt das Konfidenzintervall um das gleitende Mittel. Der Screenshot des Unterprogramms *SetSingleShotLimits.vi* zur Einstellung der Schwellwertbedingung macht die Adaption an die langsam veränderlichen Intensitäten und die hervorragende Diskriminierung kleinster Abweichungen deutlich (rote Balken). Abhängig von der Breite der gleitenden Mittelung werden Pulse an den Enden des Datensatzes aussortiert, da dort Nullen als Ersatz für nicht vorhandene Werte angefügt werden, jedoch überwiegen die Vorteile bei weitem. Der Rechenaufwand ist gering, die Prozedur wird im Allgemeinen auf allen Kanälen durchgeführt, die ein gewandeltes Signal enthalten.

Die sukzessive Überprüfung aller Schwellwertbedingungen erfolgt getrennt für die Abtastpulse *mit* (I_{2i-1}^*) und *ohne* (I_{2i}) Anregungslicht. Diskriminierte Werte werden jedoch stets paarweise in beiden Datensätzen gelöscht: falls in der k -ten Einzelmessung eine der Bedingungen für I_{2k-1}^* oder I_{2k} nicht erfüllt ist, werden beide aus dem Datensatz

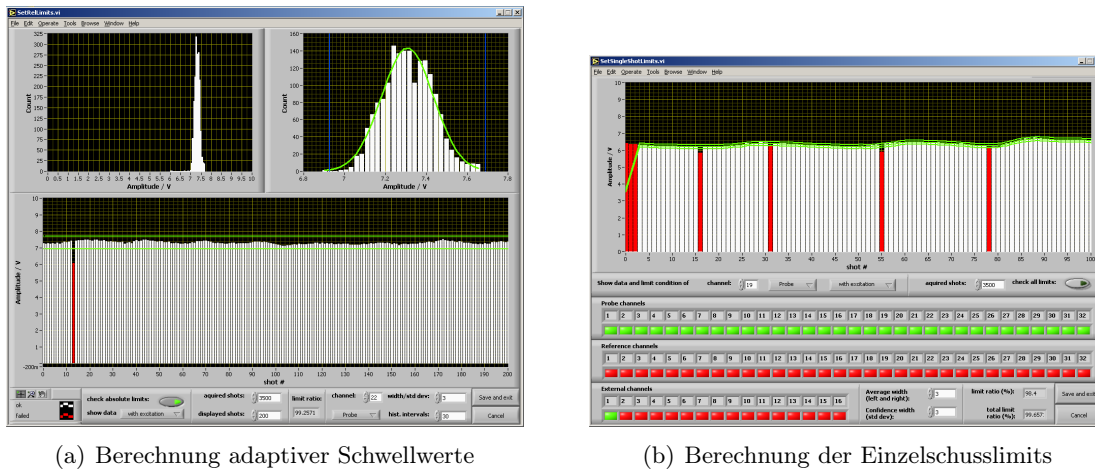


Abbildung 3.13: Screenshot des Unterprogramms *SetRelLimits.vi* zur Einstellung der adaptiven Schwellwerte

entfernt.

Ist die Anzahl der Einzelmessungen nach der Diskriminierung zu gering für eine verlässliche Berechnung der Absorptionsänderung, dann wird ein weiterer Datensatz eingelesen und gefiltert. Die Mindestanzahl der zu mittelnden Werte kann in der Software eingestellt werden: sobald diese erreicht ist, werden die zulässigen Werte aller Wiederholungen gemittelt.

Störung durch Vibrationen des Unterbrecherrades

Die beschriebene Routine zur Rauschreduktion versagt, falls es zu systematischen Abweichungen der Intensitäten bzw. Spektren zweier aufeinander folgender Abtastpulse kommt und eine nicht referenzierte Messung durchgeführt wird. Solche Störungen können durch das Unterbrecherrad erzeugt werden, da es mit dem Laser synchronisiert ist.

Ursache sind vermutlich akustische Schwingungen des Unterbrecherrades die sich z. B. durch die Oberfläche des Tisches ausbreiten und die optischen Elemente der Infraroterzeugung zu Schwingungen anregen. Die induzierten periodischen Strahlrichtungsschwankungen erzeugen periodische Schwankungen in den detektierten Spektren der Abtastpulse, was eine scheinbare Absorptionsänderungen ergibt. Um elektronische Störungen auszuschließen wurden ebenfalls Messungen ohne Unterbrecherrad durchgeführt, wobei das Signal der Photodiode im Anregungsweig mit Hilfe eines Delay-Generators vom Typ DG 535 (Stanford Research Systems, Sunnyvale, USA) emuliert wurde. In all diesen Versuchen war kein vergleichbarer Effekt festzustellen.

Abbildung 3.14(a) zeigt das Ergebnis von neun Einzelmessungen der scheinbaren Absorptionsänderung, dabei wurden jeweils 3000 Laserschüsse gemittelt. In dieser Messung wurde keine Probe eingesetzt und das Anregungslicht bereits außerhalb des Messplatzes abgeblockt, damit kann das gemessene Signal nicht auf Interaktionen von Anreg- und

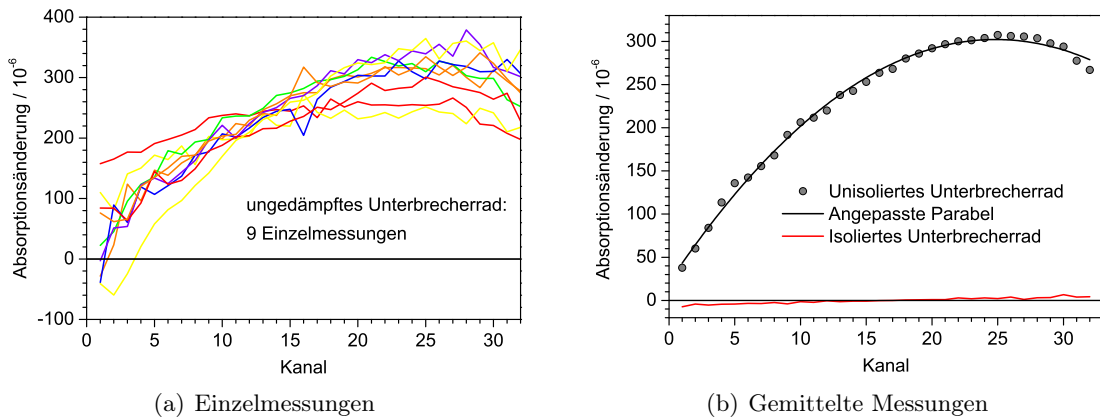


Abbildung 3.14: Das Unterbrecherrad zum Abblocken jedes zweiten Anregungspulses erzeugt Vibrationen, die stets in Phase mit dem Laserlicht sind und diese führen zu scheinbaren Absorptionsänderungen. Auf kurzen Zeitskalen können diese nicht durch Mittelung eliminiert werden (a). Die hervorgerufene Störung der Basislinie bleibt auch nach der Mittelung über alle neun Einzelmessungen erhalten und kann mit einem Polynom zweiter Ordnung angepasst werden (b). Eine schwingungs isolierte Lagerung des Unterbrecherrades reduziert die Störung signifikant.

Abtastpuls, Streulicht oder andere Störeffekte zurückgeführt werden. Man erkennt gut, dass alle Einzelmessungen neben den erwarteten Schwankungen eine systematische Abweichung der Basislinie aufweisen, diese bleibt entsprechend auch nach der Mittelung erhalten, wie Abbildung 3.14(b) belegt. Durch eine schwingungs isolierte Lagerung des Unterbrecherrades auf Gummipuffern kann die Störung effektiv unterdrückt werden, daher wurden alle auf dem optischen Tisch verbauten Einheiten damit ausgestattet.

In den unreferenzierten Messungen liegt die Amplitude dieser Störung nun im Bereich von $\Delta A \approx 10^{-5}$. Kleinere Signale sind oft nur für die konstanten, auf langen Verzögerungszeiten beobachteten residualen Signale wichtig. Diese interessierenden Spektren besitzen häufig eine schmalbandigere Struktur als die erzeugte scheinbare Absorptionsänderung, die gut mit einer Parabel angepasst werden kann. Daher kann die Struktur der Spektren herausgearbeitet werden, indem vor der Mittelung der Spektren für jede Verzögerungszeit eine entsprechende Basislinie abgezogen wird. Hierbei kann es jedoch zu Artefakten kommen, da breitbandige, echte Signale ebenfalls subtrahiert werden.

Bei Messungen im referenzierten Modus wird der Störeffekt nicht beobachtet, da die erzeugten Abweichungen im Signal- und Referenzstrahlengang bei korrekter Justage identisch sind und auf diese Weise korrigiert werden. Nach dem Ausfall einiger Detektorelemente in der Referenzzeile waren jedoch keine referenzierten Messung mehr möglich.

Ablauf einer Messung

Hier werden die einzelnen Programmschritte bei der Durchführung eines typischen transienten Absorptionsexperiments zusammengefasst. Nach der Optimierung der Anlage

und dem Einstellungen der gewünschten Parameter wird das Unterprogramm zur Aufnahme einer Messung gestartet. Dann werden programmgesteuert die folgenden Schritte ausgeführt:

1. Initialisierung des Linearverschiebetisches der Verzögerungsstrecke, Aufnahme des Hintergrundsignals über $2n$ Laserschüsse
2. Positionsreferenzierung der Rotationshalterung für die Verzögerungsplatte
3. Verfahren der Verschiebetischposition (Verzögerungszeit)
4. Einstellen der Verzögerungsplatte (Anisotropiewinkel)
5. Datenaufnahme
 - a) Einlesen von $2n$ Abtastpulsen
 - b) Filterung der Daten, Löschen ungültiger Werte
 - c) Überprüfung der Anzahl gültiger Daten, falls nicht genug vorliegen: Wiederholung bei a)
 - d) Mittelung aller gültigen Daten, evtl. gemittelte Intensitäten in Protokolldatei speichern
6. Berechnung der gemittelten relativen Transmission nach Gleichung 3.9 und 3.10, Ablegen der Werte im Arbeitsspeicher
7. Falls weitere Polarisierungen angegeben wurden: weiter bei Schritt 4.
8. Falls weitere Verzögerungszeiten anzufahren sind: weiter bei Schritt 3.
9. Speichern der gemittelten Daten dieses einen Durchlaufs (alle Verzögerungszeiten und Polarisierungen) auf der Festplatte oder einem Netzlaufwerk, Eintrag der automatisch indizierten Dateinamen in eine Indexdatei
10. Weiter bei Schritt 2.

Das Programm endet beim Auftreten von Fehlern oder falls bei der Filterung der Daten eine wählbare Anzahl von Wiederholungen der Datenaufnahme überschritten wird. Ansonsten kann es jederzeit durch den Benutzer abgebrochen werden, es werden jedoch nur die Daten vollständiger Durchläufe gespeichert. Die gespeicherten Dateien beinhalten Informationen über die eingestellten Parameter und alle Verzögerungszeiten sowie die zugehörigen relativen Transmissionen. Das Speichern nach jedem einzelnen Durchlauf erlaubt die Beurteilung der Qualität der laufenden Messung, das Verfolgen des Probenzustands (Degeneration) durch den Vergleich der ersten mit den letzten Daten und das Aussortieren einzelner Durchläufe.

3.2.3 Auswertung der transienten Absorptionsspektren

Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem sehr umfangreichen Programmpaket *z20*, das von I. Lutz und S. Spörlein an der Ludwig-Maximilians-Universität in München in der Skriptsprache *idl* entwickelt wurde. Die Details zu dem Programm können den Dissertationen der Autoren entnommen werden [131, 132].

Die von *z20* bereitgestellten Möglichkeiten beinhalten die Mittelung der einzelnen Durchläufe, Umrechnung der Werte in Absorptionsänderungen, Zuordnung von Wellenlängen zu den Kanälen, Korrektur des Zeitnullpunktes und evtl. Subtraktion einer Referenzmessung von reinem Lösungsmittel. Dazu kommen eine Reihe von Grafik- und Exportfunktionen sowie mathematische Analysefunktionen.

Für die quantitative Analyse der transienten Absorptionsspektren wird eine globale Analyse durchgeführt. Die Daten werden in eine Summe aus n exponentiellen Zerfallsfunktionen entwickelt, die mit der Apparatefunktion gefaltet sind.

$$\Delta A(\tilde{\nu}, t) = \sum_{i=1}^n A_i(\tilde{\nu}) \exp\left(\frac{w^2(\tilde{\nu})}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right) \left[\frac{1}{2} \operatorname{erf}\left(\frac{t}{w(\tilde{\nu})} - \frac{w(\tilde{\nu})}{2\tau_i}\right) + \frac{1}{2} \right] \quad (3.14)$$

Dabei ist w die Kreuzkorrelationsbreite der als gaußförmig angenommenen Anregungs- und Abtastpulse und die Fehlerfunktion $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$ die angenommene Apparatefunktion. Die Anzahl der Zeitkonstanten wird vor der Anpassungsprozedur vorgegeben und ein nichtlinearer Marquart-Algorithmus auf der Basis des Programmes *URMEL* [133] minimiert die Summe der quadratischen Abweichungen von den Daten simultan für alle Wellenzahlen und Verzögerungszeiten. Als Ergebnis erhält man die global optimierten Zeitkonstanten τ_i und deren assoziierte wellenzahlabhängige Amplituden $A_i(\tilde{\nu})$.

Zeitkonstanten und Amplituden lassen sich im Sinne eines Ratenmodells weiter interpretieren [134]. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die ablaufende Reaktion durch Populationstransfer zwischen spektral unterscheidbaren Zuständen im Sinne einer Raten-gleichung beschrieben werden können. Für die Modellierung dieser Prozesse müssen weitere Annahmen gemacht werden, beispielsweise ob die Zustände sequentiell oder parallel besetzt werden und ggf. die Verzweigungsverhältnisse und Rückreaktionsraten.

Anisotropie der transienten Absorptionsspektren

Die Beobachtung von Anisotropie und ihrem Zerfall ist vor allem für zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ein Standardverfahren. Hier werden nur die wichtigsten Merkmale und Begriffe rezitiert, für detaillierte Informationen und die mathematische Herleitung sei daher auf die Literatur verwiesen [135, 136].

Die Verwendung von linear polarisiertem Anregungslicht führt zu einer Photoselktion: es wird bevorzugt von den Molekülen absorbiert, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Polarisation des Lichtes ausgerichtet ist. Abhängig vom Winkel γ zwischen dem Übergangsdipolmoment und der Polarisationsebene des Lichtes ist die Wahrscheinlichkeit der Absorption proportional zu $\cos^2(\gamma)$ und dieselbe Überlegung gilt für das ebenfalls linear polarisierte Abtastlicht. Die detektierten transienten Absorptionsänderungen

hängen also von der relativen Polarisation von Anregungs- und Abtastlicht und der Lage der zugehörigen Übergangsdipolmomente zueinander ab, es wird also ein anisotropes Signal gemessen.

Die erzeugte Anisotropie der Verteilung angeregter Moleküle wird verringert, wenn die ursprüngliche Ausrichtung der angeregten Moleküle durch Rotation zerstört wird. Für kleinere Moleküle liegen typische Werte für diesen Rotationszerfall im Bereich von 10 ps, für große Proteine tritt praktisch kein Zerfall auf [137]. Außerdem kann das Anisotropiesignal auch zerfallen, weil weitere intra- oder intermolekulare Energietransferprozesse oder Veränderungen der Molekülgeometrie auftreten.

Zur Quantifizierung kann der Anisotropieparameter r verwendet werden, der sich aus den Absorptionsänderungen für parallele (ΔA_p) und senkrechte (ΔA_s) relative Orientierung von Anreg- und Abtastlicht bestimmen lässt:

$$r = \frac{\Delta A_p - \Delta A_s}{\Delta A_p + 2\Delta A_s} \quad (3.15)$$

Der Anisotropieparameter kann auch aus der molekularen Geometrie abgeleitet werden:

$$r = \frac{1}{5}(3 \cos^2(\theta) - 1) \quad (3.16)$$

Wobei θ der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten des angeregten und des abgetasteten Zustands ist. Stehen beide parallel ($\theta = 0^\circ$), dann erhält man einen Wert von $r = 0,4$, stehen beide senkrecht aufeinander ($\theta = 90^\circ$), dann erhält man $r = -0,2$, die Anisotropieparameter für alle anderen Winkel liegen zwischen diesen Extrema. Für $r = 0$ verschwindet die Anisotropie vollständig, beliebig orientierte Anregungs- und Abtastpolarisationen liefern dasselbe Ergebnis. Dies entspricht einem Winkel von $\theta_{\text{ma}} = 54,7^\circ$, dem sogenannten magischen Winkel.

Möchte man einen Einfluss der Rotationsdepolarisation auf die beobachtete Kinetik ausschließen, dann bietet sich eine Messung im magischen Winkel an: Zwischen Anregungs- und Abtastpolarisation wird der Winkel $\theta_{\text{ma}} = 54,7^\circ$ eingestellt, die polarisationsabhängigen Beiträge heben sich gerade auf. Alternativ kann dieses isotrope Signal auch aus polarisationsabhängigen Messungen errechnet werden:

$$\Delta A_{\text{ma}} = \frac{1}{3}(\Delta A_p + 2\Delta A_s) \quad (3.17)$$

Nach Gleichung 3.16 lassen sich aus den experimentell bestimmten Anisotropieparametern Informationen über die Molekülgeometrie ableiten. Die Umformung ergibt:

$$\theta = \arccos \left(\sqrt{\frac{1}{3} \left(\frac{5}{2}r + 1 \right)} \right) \quad (3.18)$$

Vor einer derartigen quantitativen Analyse sind jedoch einige Randbedingungen zu beachten:

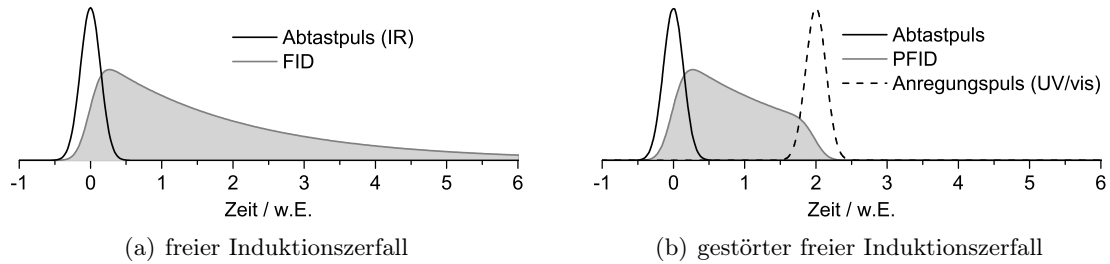


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des gestörten freien Induktionszerfalles, gezeigt sind die Amplituden der elektrischen Felder. In (a) tritt kein zusätzlicher Anregungspuls auf, in (b) wird die zerfallende kohärente Polarisation bei $t = 2$ durch den Anregungspuls gestört.

- Um die Anisotropie eines Kanals zu berechnen, dürfen im ausgewerteten Zeitbereich keine Nullstellen auftreten.
- Eine Berechnung ist zudem nur sinnvoll wenn isolierte Differenzbanden vorliegen, deren Signale sich einem einzelnen Übergang zuordnen lassen.
- Bei Ensemblemessungen muss die Flexibilität der Moleküle beachtet werden. Eine direkte Berechnung der Winkel nach Gleichung 3.16 ist dann nicht zulässig. Beispielsweise kann ein berechneter Wert von $\theta = 54,7^\circ$ bedeuten, dass genau dieser Winkel oder eine vollkommen isotrope Verteilung über alle Winkel vorlag.
- Es wird in jedem Fall nur der Erwartungswert des Winkels ermittelt, über die Breite der Verteilung lassen sich keine Aussagen herleiten.

3.3 Effekte in fs-IR-Messungen

3.3.1 Gestörter freier Induktionszerfall

Die resonante Absorption des kurzen Abtastlichtpulses durch eine Substanz induziert eine kohärente Polarisation, welche mit der Dephasierungszeit T_2 zerfällt. Dabei wird Licht in Richtung des ursprünglichen Pulses abgestrahlt, dieser freie Induktionszerfall (FID³⁶) wird vom Detektor aufgezeichnet. Eine Störung des Systems, die die Resonanzfrequenz oder die Oszillatorstärke des Überganges beeinflusst, beendet den freien Induktionszerfall und wirkt sich somit auf die detektierte Intensität aus. Als Folge wird ein Differenzsignal zum ungestörten Zerfall aufgezeichnet, welches man als gestörten freien Induktionszerfall (PFID³⁷) bezeichnet. Bei den hier durchgeführten Experimenten ist das bei negativen Verzögerungszeiten zu berücksichtigen: Zunächst wird der IR-Puls absorbiert, die zerfallende Polarisation wird durch die elektronische Anregung des zeitlich nachfolgenden UV/vis-Anregungspulses gestört. Das wird in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt.

³⁶engl.: Free Induction Decay

³⁷engl.: Perturbed Free Induction Decay

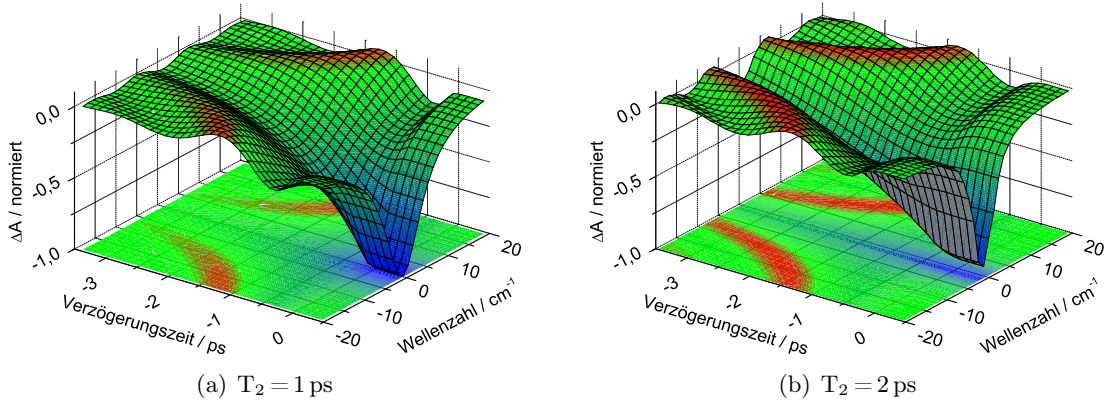


Abbildung 3.16: Simulation des Differenzsignals, das durch den gestörten freien Induktionszerfall entsteht, für zwei verschiedene Dephasierungszeiten mit δ -förmigen Anreg- und Abtastpulsen nach Gleichung 3.20.

Die Dephasierungszeit ist mit der Bandbreite des zugehörigen Überganges verknüpft, für eine homogen verbreiterte Absorptionslinie ergibt sich mit der Halbwertsbreite $\Delta\tilde{\nu}$ und der Lichtgeschwindigkeit c eine Dephasierungszeit von:

$$T_2 = \frac{1}{\pi c \Delta\tilde{\nu}} \quad (3.19)$$

Die typische Bandbreite einer IR-Absorptionslinie von 10 cm^{-1} entspricht einer Dephasierungszeit von $T_2 \approx 1$ ps, liegt also deutlich über den verwendeten Pulsdauern in Anregung und Abtastung. Im Allgemeinen sind die Absorptionsbanden von Molekülen im UV/vis-Bereich wesentlich breiter und es ergeben sich kürzere Dephasierungszeiten ($T_2 \leq 10$ fs), so dass der Zerfall dieser Polarisation hier vernachlässigt werden kann.

Unter der Annahme von δ -Pulsen kann die Transmissionsänderung näherungsweise beschrieben werden [138]:

$$\Delta T(t, \omega) \propto \begin{cases} -e^{-\frac{t}{T_2}} \frac{\frac{1}{T_2} \cos[(\omega - \omega_0)t] - (\omega - \omega_0) \sin[(\omega - \omega_0)t]}{(\omega - \omega_0)^2 + (\frac{1}{T_2})^2} & \text{für } t \leq 0 \\ -\frac{\frac{1}{T_2}}{(\omega - \omega_0)^2 + (\frac{1}{T_2})^2} & \text{für } t > 0. \end{cases} \quad (3.20)$$

Mit der Abtastfrequenz ω , der Verzögerungszeit t und der Resonanzfrequenz des betrachteten Übergangs ω_0 . Für hinreichend kleine Transmissionsänderungen kann die detektierte Absorptionsdifferenz wie folgt berechnet werden:

$$\Delta A(t, \omega) = -\frac{\Delta T(t, \omega)}{\ln(10)} \quad (3.21)$$

Abbildung 3.16 zeigt die nach Gleichung 3.20 simulierte Absorptionsänderungen verschiedener Dephasierungszeiten, die Wellenzahlen sind als Differenz zur Position des

Übergangs aufgetragen. Auf der Resonanzwellenzahl ergibt sich bei negativen Zeiten ein exponentieller Abfall des Differenzsignals mit T_2 . Der übrige Spektralbereich zeigt zeitliche Oszillationen, deren Frequenz dem Unterschied zwischen Absorptions- und Abtastwellenzahl entspricht. Gut zu erkennen ist auch der Zusammenhang zwischen der Bandbreite und dem Zeitbereich in dem der Effekt ein signifikantes Signal liefert.

Weitere Informationen zur Modellierung dieses Effektes und seiner Anwendung kann in [138–140] nachgelesen werden, hier werden lediglich die für diese Arbeit wesentliche Aspekte angesprochen. Die Berechnung mit endlichen Pulsdauern ergibt eine sehr ähnliche Signatur, wobei die Signale bei $t = 0$ geglättet und die Oszillationen in den Flanken des Abtastpulsspektrums betont werden. Außerdem lässt sich das Modell erweitern, so dass es für überlagerte und inhomogen verbreiterte Absorptionslinien sowie die positiven Signale der schwingungsangeregten Zustände anwendbar ist [138].

Aus dem gestörten freien Induktionszerfall ergeben sich keine Informationen über die lichtinduzierte Reaktionskinetik der Probe, jedoch lassen sich Position und Breite der Banden bestimmen, die direkt durch die Absorption des UV/vis-Anregungslichtes beeinflusst werden. Auf eine Unterdrückung dieser kohärenten Beiträge, wie sie z. B. mit zweidimensionalen Fourierfilterfunktionen demonstriert wurde [141], wird daher verzichtet.

3.3.2 Kohärente Absorption von Gasen

Die partielle Absorption der MIR-Abtastpulse durch die in der Luft enthaltenen Gase wie CO_2 und H_2O hat einen großen Einfluss auf die transienten IR-Spektren. Zwar werden die schmalen Banden der beobachteten Rotationsschwingungsübergänge spektral nicht aufgelöst, aber die Absorption dieser diskreten Linien führt zu einem veränderten Spektrum und moduliert so auch den zeitlichen Verlauf des Pulses. Darüberhinaus induziert die Absorption durch die Gasmoleküle eine kohärente Polarisierung und damit einen freien Induktionszerfall. Das dabei emittierte MIR-Licht kann in der Folge wieder absorbiert werden und die zu verschiedenen Zeiten an unterschiedlichen Orten abgestrahlten Wellen interferieren und erzeugen so einen komplexen Pulszug. Entsprechend der geringen Linienbreite der Rotationsschwingungsübergänge in Gasen und der damit verbundenen großen T_2 -Zeit kann die abfallende Flanke des Pulses um einige zehn Pikosekunden verzerrt werden. Um diesen Störeinfluss zu beseitigen wird der gesamte Messplatz mit getrockneter CO_2 -freier Luft gespült, die über einem PG85L Spülgasgenerator erzeugt wird (vgl. Abschnitt 3.1.4, S. 37). Der Luftfeuchtigkeitsgehalt wird mit einem Taupunktsensor vom Typ FHA646DTC1 in Verbindung mit einem ALMEMO 2390-5 Messgerät (Ahlborn, Holzkirchen) gemessen und kann während der Messung zur späteren Validierung der Daten aufgezeichnet werden.

Im Bereich der Absorptionsbanden von Wasserdampf kann der Effekt beobachtet und mit dem im Kasten gemessenen Wasserdampfgehalt bzw. der Taupunkttemperatur korreliert werden. Abbildung 3.17 zeigt die transiente Absorptionsänderung in einem 0,5 mm dicken ZnSe-Substrat für den gespülten und ungespülten Kasten unter ansonsten identischen Einstellungen. Zu erwarten ist eine unmittelbar mit der Anregung von Elek-

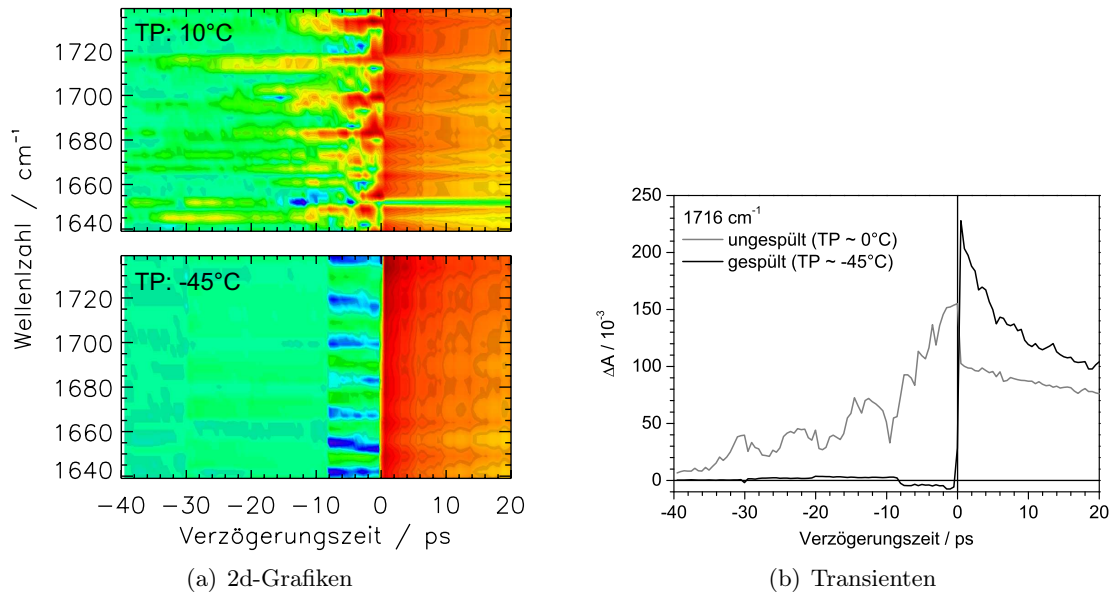


Abbildung 3.17: Die Absorptionsbanden von Gasen wie Wasser oder CO_2 führen zu kohärenten Effekten, die die erzeugten kurzen IR-Pulse sowohl in der Frequenz- als auch in der Zeitdomäne beeinflussen. Die Spülung mit trockener, CO_2 -freier Luft beseitigt das Problem. Unterhalb eines Taupunktes im Detektionskasten von -40° sind nur noch regelmäßige Muster als Folge des Fabry-Perot-Etalon-Effekts zu beobachten.

tronen ins Leitungsband auftretende Absorptionszunahme im gesamten beobachteten Spektralbereich, die auf der Zeitskala von einigen zehn Pikosekunden wieder zerfällt. Bei einer Taupunkttemperatur von 10°C erkennt man das zusätzliche, komplexe Differenzsignal, welches sich von etwa -45 ps bis in den positiven Zeitbereich erstreckt. Die Transiente (Abb. 3.17(b)) macht deutlich, dass z. T. eine erhebliche Verzerrung der Pulsform aufgetreten ist, welche bei einer Taupunkttemperatur von $< -40^\circ\text{C}$ nicht mehr beobachtet wird.

Eine derartige Pulsverformung wurde auch für CO_2 [142, 143] und andere Gase [144, 145] bereits eingehend untersucht. Die auch bei niedrigem Wasserdampfgehalt auftretenden kleinen, zeitlich und spektral sehr regelmäßigen Signale sind dem Fabry-Perot-Etalon-Effekt zuzuordnen und werden gesondert erklärt.

3.3.3 Fabry-Perot-Etalon-Effekt

Bei Messungen an nicht AR-beschichteten Halbleitersubstanzen kann ein erheblicher Anteil des Abtastlichtes an den Oberflächen des Substrates reflektiert werden, was wiederum zu Interferenzen analog einem Fabry-Perot-Etalon führt. Mehrfachreflexionen generieren kleine nachlaufende IR-Pulse, deren Zeitverzögerung sich aus Brechungsindex n , Dicke des Materials d , Winkel zwischen Lichtstrahl und Oberflächennormale α und Lichtgeschwindigkeit errechnen lässt: $\Delta t = 2nd/(c \cos(\alpha))$. Mit einem Brechungsindex

von $n = 2,4$ und einer Dicke von $0,5 \text{ mm}$ ergibt sich für das ZnSe-Substrat eine Zeitverzögerung von 8 ps , was gut mit dem Verlauf der Signale bei negativen Verzögerungszeiten übereinstimmt. Die zweite Stufe, die in den 2d-Grafiken und in der Transiente bei etwa -30 ps auftritt, ist auf einen im Strahlengang befindlichen und um etwa 30° zum Strahl verkippten Germaniumfilter zurückzuführen ($n = 4$, $d = 1 \text{ mm}$).

Die spektrale Modulation der Signale ist auf die Interferenz zwischen dem Reflex und dem direkt transmittierten Anteil zurückzuführen. Es erscheint überraschend, dass diese beiden Pulse trotz ihres zeitlichen Abstandes von 8 ps , der die Pulsdauer von unter $0,3 \text{ ps}$ weit übertrifft, miteinander überlagert werden können. Ursache dafür ist die spektral aufgelöste Detektion, da die Separation der Frequenzkomponenten im Spektrometer mit einer Verlängerung der Pulsdauer verbunden ist, so dass sich Originalpuls und Nachläufer räumlich und zeitlich teilweise überlagern.

Maximale Transmission wird erreicht, falls der Gangunterschied $2d\sqrt{n^2 - \sin^2(\alpha)}$ ein ganzzahliges Vielfaches m der Wellenlänge λ_1 ist, dabei ist α der Winkel zur Flächennormalen. Es gilt also $m\lambda_1 = 2d\sqrt{n^2 - \sin^2(\alpha)}$ und für das benachbarte Transmissionsmaximum entsprechend: $(m + 1)\lambda_2 = 2d\sqrt{n^2 - \sin^2(\alpha)}$. Mit $m(\lambda_1 - \lambda_2) = \lambda_2$ erhält man den Abstand zweier Transmissionsmaxima:

$$\lambda_1 - \lambda_2 = \frac{\lambda_2}{m} = \frac{\lambda_2 \lambda_1}{2d\sqrt{n^2 - \sin^2(\alpha)}} \quad (3.22)$$

Für senkrechten Einfall vereinfacht sich die Beziehung zu:

$$\lambda_1 - \lambda_2 = \frac{\lambda_2 \lambda_1}{2nd} \quad (3.23)$$

$$\Delta\lambda \approx \frac{\lambda^2}{2nd} \quad (3.24)$$

Die Wellenlänge des gezeigten Messbereiches liegt bei etwa $5,93 \mu\text{m}$, die Dicke des ZnSe-Substrats ist $500 \mu\text{m}$ und sein Brechungsindex $2,4$. Man erwartet also einen Abstand der Maxima von $\Delta\lambda \approx 15 \text{ nm}$, es wird jedoch ein Abstand von etwa 55 nm in den Spektren gefunden. Die Ursache dafür ist die zu geringe räumliche Abtastrate des entstehenden Interferenzmusters durch die Elemente des Detektorsystems: der Kanalabstand beträgt bei dem hier verwendeten Gitter etwa 12 nm . Die beobachtete spektrale Modulation ist also auf einen Moiré -Effekt zurückzuführen. Dasselbe wurde bei einem vergleichbaren Experiment zur transienten Absorption im sichtbaren Spektralbereich gefunden und für diesen Aufbau systematisch untersucht [146].

Für die in dieser Arbeit untersuchten Proben wird dieser Effekt nicht beobachtet, da die Reflexionsverluste von der Änderung des Brechungsindex abhängen und bei allen Substanzen zu vernachlässigen sind. Daher wird hier auf weitergehende Ausführungen verzichtet.

3.3.4 Kohärentes Artefakt: Kreuzphasenmodulation

Bei räumlicher und zeitlicher Überlagerung von Anreg- und Abtastpuls in der Probenzelle können nichtlineare optische Mischprozesse auftreten, die sich auch als scheinbares Signal

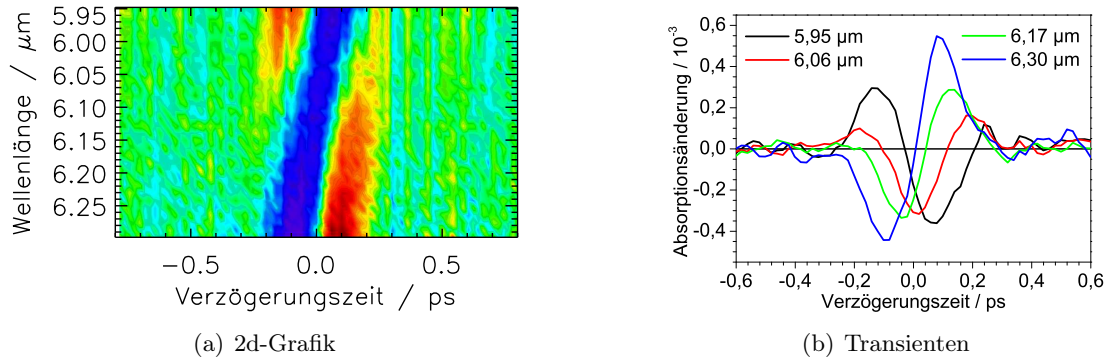


Abbildung 3.18: Messung der Kreuzphasenmodulation in 50 μm D₂O (a). Die Anregung erfolgte mit dem NOPA bei 525 nm, die Polarisationen von Anreg- und Abtastlicht waren parallel, die Schrittweite betrug 20 fs. Die Transienten in (b) wurden leicht geglättet (Savitsky-Golay, 2. Ordnung, über 7 Punkte).

in den transienten Absorptionsspektren wiederfinden. Diese Prozesse treten nur innerhalb der Kreuzkorrelationsbreite der beiden Pulse auf und sie beruhen nicht auf der Anregung der Probe, sondern auf der Wechselwirkung der intensiven Lichtpulse mit dem optisch dichten Medium – wie den Küvettenfenstern oder dem Lösungsmittel. Deshalb werden diese Beiträge allgemein als Lösungsmittelsignal oder kohärentes Artefakt bezeichnet und es lassen sich keine Aussagen über die Photodynamik der Probe daraus ableiten.

Insbesondere für die breitbandige Abtastung mit Weißlicht im sichtbaren Spektralbereich wurden die zugrundeliegenden Prozesse bereits eingehend untersucht und theoretisch beschrieben bzw. modelliert [147–152]. Die wichtigsten Beiträge werden dabei von den folgenden nichtlinearen optischen Prozessen dritter Ordnung verursacht: Kreuzphasenmodulation, Zweiquantenabsorption und impulsive stimulierte Ramanstreuung. Für die Abtastung im sichtbaren Spektralbereich wurde gezeigt, dass die erhaltenen Daten mit der Subtraktion des unter identischen Bedingungen gemessenen und korrekt skalierten Lösungsmittelsignals weitgehend korrigiert werden können [147]. Darüber hinaus können aus der Anpassung des Lösungsmittelsignals mit einer Modellfunktion experimentelle Parameter wie Kreuzkorrelationsbreite und Zeitnullpunkt für jede detektierte Wellenlänge ermittelt werden. Die Funktionen zur Analyse und Korrektur des Artefaktes sind in der Auswertesoftware *z20* implementiert, weitere Details finden sich in den Dissertationen ihrer Entwickler [131, 132].

Im MIR-Bereich ist das kohärente Artefakt am Zeitnullpunkt allein auf die Kreuzphasenmodulation (*XPM*³⁸) zurückzuführen, die auf dem optischen Kerr-Effekt beruht [147–149]: Die Propagation des intensiven Anregungspulses mit der Einhüllenden $E(t)$ erzeugt eine zeitabhängige Modulation des Realteils des Brechungsindex $n(t)$ eines optisch dichten Mediums:

$$n(t) = n_0 + n_2|E(t)|^2 \quad (3.25)$$

Innerhalb der Kreuzkorrelationszeit erfährt der breitbandige Abtastpuls durch den verän-

³⁸XPM: Cross Phase Modulation

derten Brechungsindex eine Phasenverschiebung der enthaltenen Frequenzkomponenten, was zu einem veränderten Spektrum führt. Diese spektrale Verschiebung ist nicht durch einen Energietransfer von oder zum Medium bedingt, die Gesamtenergie des Abtastpulses bleibt also erhalten. Da bei den hier durchgeführten Experimenten die Anregungspulse stets wesentlich intensiver als die Abtastpulse waren, kann die Selbstphasenmodulation durch den Abtastpuls vernachlässigt werden.

Abbildung 3.18 zeigt eine 2d-Grafik der transienten Absorptionsspektren und ausgewählte Transienten eines typischen XPM-Signals. Gemessen wurde eine im Bereich der Anregungswellenlänge transparente D₂O-Pufferlösung, die Küvette mit einer Schichtdicke von 50 μm bestand aus zwei jeweils 2 mm dicken CaF₂-Fenstern. Aufgrund der Geometrie kann davon ausgegangen werden, dass der XPM-Effekt im wesentlichen auf die Wechselwirkung im CaF₂-Substrat entsteht, eine Messung an einem einzelnen Fenster ergibt ein vergleichbares Signal (vgl. Abb. 4.5(c), S. 82). Die genaue Signatur und die Größe des XPM-Signals hängt vom Medium und den Parametern der verwendeten Pulse ab. Eine Verringerung der Feldstärke der Anregungspulse durch schwächere Fokussierung oder geringere Anregungsintensitäten ist oft nicht möglich, da damit auch das Signal der Probe verringert wird. Allerdings führt die Messung mit senkrecht zueinander polarisiertem Anreg- und Abtastlicht zu kleineren Artefakten um den Zeitnullpunkt als bei paralleler Orientierung.

Bei den hier durchgeführten Messungen im MIR-Bereich hat sich eine Korrektur durch Subtraktion des Lösungsmittelsignals als nicht praktikabel erwiesen: es konnte keine simultane Kompensation auf allen Kanälen erreicht werden. Möglicherweise kann der Einfluss der Probe auf beide Pulse sowie auf den Brechungsindex der Lösung nicht vernachlässigt werden. Außerdem lässt sich der korrekte Skalierungsfaktor wegen des überlagerten PFID-Effektes nicht eindeutig bestimmen. Bei transienten Spektren, in denen ein wesentlicher Einfluss der Kreuzphasenmodulation auftritt wurde deshalb die quantitative Analyse auf den Zeitbereich nach dem kohärenten Artefakt eingeschränkt.

3.4 Bestimmung von Zeitnullpunkt und Zeitauflösung

Aufgrund der kohärenten Effekte wie XPM und PFID ist eine Bestimmung des Zeitnullpunktes aus den erhaltenen Datensätzen der Probenmessung häufig unmöglich. Diese Parameter werden deswegen aus einer Messung der transienten Absorptionsänderung eines 500 μm dicken ZnSe-Substrates unter identischen Bedingungen ermittelt, die gleichzeitig dem Optimieren der Apparatur dient.

Nach der Anregung von Elektronen in das Leitungsband absorbieren diese breitbandig im MIR, es kommt also innerhalb der Anregungspulsdauer zu einer Absorptionzunahme (vgl. Abb. 3.17(a), S. 65). Wie die in Abbildung 3.19(a) dargestellten Transienten veranschaulichen, erfolgt der Anstieg des Signals jedoch langsam, da die unmittelbare Absorptionzunahme mit der Instrumentenantwortfunktion gefaltet ist. Gut zu erkennen sind auch die wegen des Fabry-Perot-Etalon-Effekts leicht verschobenen Basislinien der einzelnen Kurven bei $t < -0,2$ ps sowie das überlagerte XPM-Signal.

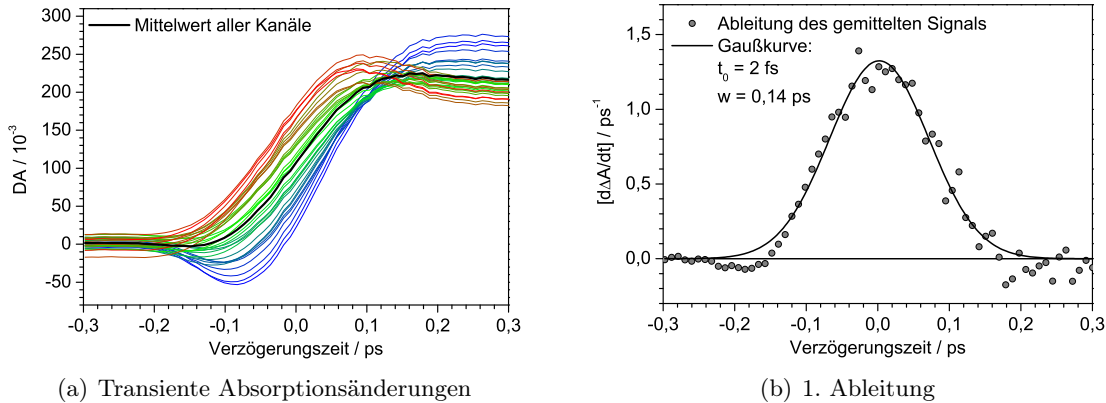


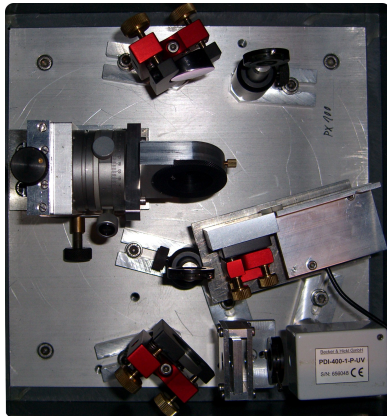
Abbildung 3.19: Messung der instantanen Absorptionszunahme nach Anregung des ZnSe-Substrates bei 425 nm mit etwa 800 nJ Pulsenergie. Die einzelnen Transienten sind durch die Kreuzphasenmodulation und den Fabry-Perot-Etalon-Effekt überlagert. Diese Effekte kompensieren sich bei Mittelung über alle Kanäle (a). Die Ableitung der gemittelten Werte kann durch eine Gaußkurve ($f(t) = A \exp(-2(t - t_0)/w)^2$) angepasst werden (b), aus der Anpassung lassen sich der Zeitnullpunkt t_0 und die Kreuzkorrelationsbreite w abschätzen.

Durch Mittelung über alle Kanäle werden beide Effekte im Idealfall vollständig kompensiert und man erhält eine einzelne Transiente, die einer nicht spektral aufgelösten Messung entspricht. Der Anstieg des gemittelten Signals entspricht einer Faltung aus Stufenfunktion und Kreuzkorrelationsfunktion aus Anreg- und Abtastpuls, die hier als Gaußkurve anzusehen ist. Der Zeitverlauf kann also durch eine Fehlerfunktion modelliert werden (vgl. Gl. 3.14, S. 60). Bildet man die erste Ableitung dieser Kurve (Abb. 3.19(b)), erhält man direkt die Kreuzkorrelationsfunktion und kann aus den Parametern der angepassten Gaußkurve die Kreuzkorrelationsbreite sowie den Zeitnullpunkt mit hoher Genauigkeit ermitteln.

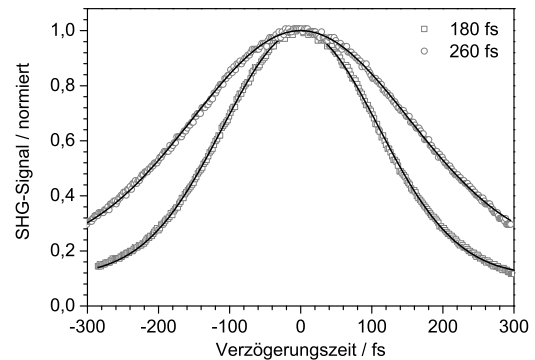
Im sichtbaren Spektralbereich kann die Wellenlängenabhängigkeit der Zeitnullpunkte nicht vernachlässigt werden, weil die unkomprimierten Weißlicht-Abtastpulse einen starken Chirp besitzen und zusätzliche Dispersion in optischen Materialien auftritt. Im MIR wurde dagegen durch eine Anpassung des in Abbildung 3.18 gezeigten Lösungsmittelsignals nach [147] festgestellt, dass dieser Effekt geringer als die üblicherweise verwendete geringste Schrittweite von 100 fs ist. Wegen der überlagerten kohärenten Effekte ist eine exakte Bestimmung des Zeitnullpunktes für jeden einzelnen Kanal gemeinhin unmöglich, deshalb wurde auf eine derartige Korrektur in den transienten IR-Spektren verzichtet.

3.5 Der Autokorrelator

Um die Einstellung des Prismenkompressors nach dem NOPA oder auch des im CPA integrierten Gitterkompressors zu optimieren und die resultierenden kurzen Pulsdauern ausreichend genau messen zu können, wurde ein kompakter Intensitätsautokorrelator



(a) Aufbau des Autokorrelators



(b) Autokorrelationskurven des Lasers

Abbildung 3.20: Aufbau des Autokorrelators (a) in der Draufsicht und Autokorrelationskurven der Laserfundamentalen für verschiedene Kompressoreinstellungen (b).

Das Licht wird über eine Irisblende (oben rechts) eingekoppelt und durch einen geteilten Spiegel in zwei Teile aufgespalten und auf den Off-Axis-Parabolspiegel gelenkt. Während eine Spiegelhälfte fest montiert ist wird die andere durch einen Piezo-Verschiebetisch kontinuierlich bewegt. Der Paraboloid fokussiert beide Strahlen in den BBO-Kristall, wo es zur Summenfrequenzmischung kommt. Das SFG-Signal wird mit Irisblenden und Farbgläsern räumlich und spektral gefiltert und von einer empfindlichen Photodiode detektiert.

aufgebaut. Das Konzept folgte direkt der Veröffentlichung von Kozma *et al.* [153], in der bereits die Funktionsweise sowie alle technischen Details hervorragend erklärt sind. Um das Gerät flexibel einsetzen zu können, wurde der gesamte optische Aufbau auf einer Aluminiumgrundplatte aufgebaut, deren Füße mit Pratzen auf dem optischen Tisch befestigt werden können. Abbildung 3.20 enthält ein Foto des optischen Aufbaus sowie die Daten und angepassten Autokorrelationskurven der Laserfundamentalen mit unterschiedlicher Kompression.

Um die Autokorrelationsfunktion zu messen, werden die Laserpulse zunächst an einem geteilten Spiegel in zwei Hälften aufgespalten und relativ zueinander verzögert. Eine Spiegelhälfte ist an einem PX 100 Piezoverschiebetisch (Piezosystem Jena, Jena) mit einem Verfahrensweg von 100 μm befestigt, die andere an einem Spiegelhalter der auch transversal verstellbar ist und die Einstellung des Zeitnullpunktes erlaubt. Zur Ansteuerung des Piezoelements wird mit einer Eigenbauelektronik mit einem Funktionsgenerator vom Typ ICL-8038A eine periodische ($f \approx 2 \text{ Hz}$) Sägezahnspannung erzeugt, deren Spannungslage und Amplitude mit einem nachgeschalteten Operationsverstärker IC-741 variiert werden kann. Um Schwingungen des Piezotisches auf der steil abfallenden Flanke zu vermeiden, wird das Signal zunächst durch ein RC-Glied tiefpassgefiltert und dann an den Eingang des Piezo-Verstärkers 5V10 (Piezosystem Jena, Jena) gelegt. Aus der Steuerspannung kann die Position des Verschiebetisches mittels einer zuvor interferometrisch bestimmten Kalibrierkurve bestimmt werden.

Beide Teilstrahlen werden auf einen silberbeschichteten 30°-Off-Axis-Parabolspiegel mit

einer Brennweite von 51 mm gelenkt und von diesem in den BBO-Kristall fokussiert. Die Rotationseinheit erlaubt die präzise Justage des Kristallwinkels, so dass die Typ I-Phasen-anpassungsbedingung für die Summenfrequenzerzeugung beider Teilstrahlen erfüllt ist. Je nach Wellenlänge kommen unterschiedliche Kristalle zum Einsatz, eine Übersicht findet sich in Tabelle 3.1 auf Seite 37. Wegen der nicht-kollinearen Einkopplung der beiden Teilstrahlen in das nichtlineare Medium besitzen das SFG-Signal und die beiden Teilstrahlen bzw. deren frequenzverdoppelte Anteile unterschiedliche Richtungen. Aufgrund dieser räumlichen Trennung kann das SFG-Signal mit einer Irisblende isoliert werden, zusätzliche Farbglasfilter eliminieren noch vorhandenes Streulicht der wesentlich intensiveren Fundamentalpulse. Die SFG-Pulse werden von einer empfindlichen Siliziumphotodiode PDI-400-1-P-UV (Becker & Hickl GmbH, Berlin) detektiert, deren eingebaute Integrierelektronik 1,5 μ s nach dem Laserpuls ein der Intensität proportionales Maximum aufweist.

Aus dem Triggerpuls des Lasers wird mit einer monostabilen Kippschaltung³⁹ auf Basis eines SN74LS123 ein beliebig verzögertes Triggersignal generiert, welches auf das Maximum des Photodiodensignals abgestimmt wird. So synchronisiert werden nun in Echtzeit für 1000 Laserschüsse das Photodiodensignal sowie die Steuerspannung des Piezotisches mit einer ADC-Karte vom Typ DAQCard-6024E (National Instruments, München) eingelesen und über die PCMCIA-Schnittstelle an einen Laptop-Computer übertragen.

Das LabVIEW-basierte Messprogramm selektiert zunächst die Daten einer vollständigen Spannungsrampe der Piezosteuerung und stellt für diesen Bereich die gemessene SFG-Intensität gegen den Zeitversatz in einem Diagramm dar. Zusätzlich wird eine Gaußkurve mit einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus an die Messdaten angepasst und in das Diagramm eingefügt. Deren Parameter und die daraus errechneten Pulsdauern (FWHM) für Gauß- und sech²-Pulsformen werden ebenfalls ausgegeben. Die Software ermöglicht das Speichern der Autokorrelationskurven und der daran angepassten Funktionen sowie die Aufnahme und Auswertung der interferometrischen Kalibrierung des Piezoverschiebetisches.

Das vorgestellte Gerät ermöglicht die Messung der Autokorrelationsfunktion 2. Ordnung, die zeitsymmetrisch ist. Informationen über den zeitlichen Verlauf der erzeugten Pulse in Hinblick auf zeitliche Asymmetrien der Lichtpulse können über die Autokorrelationsfunktion 3. Ordnung ermittelt werden, die z. B. durch verschiedene interferometrische Messtechniken bestimmt werden kann [154]. Heutzutage sind vor allem zwei Standardverfahren etabliert: Bei FROG⁴⁰ wird über verschiedene nichtlineare optische Prozesse das zeitabhängige Frequenzspektrum des unbekanntes Pulses gemessen [155, 156]. Bei SPIDER⁴¹ werden zwei gegeneinander verzögerten Kopien des unbekanntes Pulses mit einem stark gechirpten dritten Puls aus derselben Quelle in einem nichtlinearen Medium frequenzkonvertiert und anschließend in einem Spektrometer überlagert. Aus dem dabei

³⁹engl.: Monoflop

⁴⁰engl.: Frequency Resolved Optical Gating

⁴¹engl.: Spectral Phase Interferometry for Direct Electric field Reconstruction

entstehenden Interferogramm kann der gesamte Phasen- und Intensitätsverlauf errechnet werden [157, 158]. Die Variante ZAP-SPIDER⁴² kommt ohne weitere optische Elemente zwischen dem Testpuls und dem nichtlinearen Medium aus, so dass der Puls unter denselben Bedingungen gemessen werden kann, wie sie z. B. am Probenort vorliegen [159]. Da sowohl DFG als auch SFG zur Frequenzkonversion eingesetzt werden, können Pulse aus einem breiten Frequenzspektrum, also auch aus dem infraroten Spektralbereich, charakterisiert werden [124, 160, 161].

Sowohl bei FROG als auch bei SPIDER lässt sich durch Phasenrekonstruktion und Fouriertransformation eine vollständige Charakterisierung der Pulse bezüglich des Verlaufes von Intensität, Frequenz und Phase erreichen. Jedoch sind beide Aufbauten wesentlich komplexer und somit aufwendiger in Konstruktion, Datenauswertung und Bedienung als der vorgestellte Autokorrelator. Dieser erfüllt die gestellten Messaufgaben mit geringstem Platz- und Justagebedarf und lässt sich zudem leicht zu den verschiedenen Experimenten transportieren und dort einsetzen. Insgesamt hat sich diese kostengünstige und einfache Lösung im Laboralltag bewährt, so dass in der Arbeitsgruppe inzwischen ein zweiter Autokorrelator desselben Prinzips aufgebaut wurde. Dieser besitzt einen Verschiebetisch mit einem längeren Verfahrensweg von 400 μm , was einen anderen Piezoverstärker und somit Anpassungen in der Ansteuerelektronik erforderte, stimmt ansonsten aber mit der beschriebenen Variante überein.

⁴²engl.: Zero Additional Phase shift Spectral Phase Interferometry for Direct Electric field Reconstruction

4 Nitrophenylacetat – photolabiles CO₂

Wenn zwei Menschen immer dasselbe
denken, ist einer von ihnen überflüssig.

(Winston Spencer Churchill)

In diesem Kapitel werden die Messungen der Photodecarboxylierungsreaktion der Konstitutionsisomere des Nitrophenylacetats (*NPA*) vorgestellt. Da die Absorptionsbande des entstehenden CO₂ im MIR-Bereich spektral isoliert vorliegt, können die Differenzsignale dieses Produktes eindeutig identifiziert werden und erlauben somit die direkte Messung der Freisetzung von CO₂. Diese Spektren zeigen eindeutig die überlegene Struktursensitivität der zeitaufgelösten Schwingungsspektroskopie im Vergleich zur Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich.

Nach einer kurzen Einführung in die Thematik der *caged compounds* und der Motivation der Fragestellung werden zunächst am Beispiel von *meta*-*NPA* die in den transienten Spektren auftretenden Effekte erklärt. Anschließend werden die Ergebnisse für *ortho*-, *meta*- und *para*-*NPA* verglichen und diskutiert. Die Photochemie der organischen Verbindungen erweist sich als sehr komplex und es ergibt sich ein großer Einfluss der Konstitution.

4.1 Einleitung

Photolabile Schutzgruppen erlauben die lichtgesteuerte Freisetzung bzw. Aktivierung eines chemisch oder biologisch relevanten Substrates [162]. Heutzutage spielen sie eine große Rolle in der organischen Synthese [163, 164], da sie entscheidende Vorteile gegenüber konventionellen Reagenzien haben. Die Bestrahlung mit Licht ist eine einfache und schonende Methode zur Entfernung der Schutzgruppen, es ist weder ein Erhitzen notwendig, noch die Zugabe weiterer Stoffe, die evtl. zu Nebenreaktionen führen und dann aus dem Reaktionsansatz abzutrennen wären.

In der Untersuchung biologischer Funktionen und enzymatischer Reaktionen haben sich durch die Verwendung photoaktivierbarer Substanzen vollkommen neuartige Untersuchungsmöglichkeiten ergeben. Begonnen hat diese Entwicklung mit der Arbeit von Kaplan *et al.* [165], die photoaktivierbares ATP¹ verwendeten um die Aktivität des Enzyms ATPase zu untersuchen. Das verwendete inaktivierte Molekül zerfällt unter Bestrahlung ($\lambda = 340$ nm) in ATP und ein Nitrobenzylderivat, welches als photolabile

¹ATP: Adenosintriphosphat

Schutzgruppe fungiert. Für das biologisch inaktive Vorläufermolekül wurde der Begriff *caged ATP* verwendet. Daraus wurde der Begriff *caged compound* abgeleitet, der heutzutage als Bezeichnung für derartige Moleküle etabliert ist.

Die Lichtaktivierung hat dabei zwei entscheidende Vorteile gegenüber anderen Verfahren: Einerseits wird über eine hinreichend schnelle Photoreaktion mit einem intensiven Photolysepuls eine synchronisierte Aktivierung des Wirkstoffes erreicht, so dass die Reaktion dann zeitaufgelöst verfolgt werden kann. Andererseits erfolgt die Aktivierung bei Verwendung von fokussiertem Laserlicht in einem räumlich sehr begrenzten Bereich – bei Zweiphotonen-Absorption liegen die Volumina sogar nur im Bereich von Femtolitern.

Heute ist die Verwendung photoaktivierbarer Spezies zur Untersuchung biochemischer Reaktionen *in vivo* und *in vitro* weit verbreitet und zahlreiche erprobte Substanzen sind bereits kommerziell erhältlich. Für weitere Informationen sei auf Übersichtsartikel zur ihrer Anwendung hingewiesen [19, 166–168]. Ein wesentlicher Anteil der eingesetzten Schutzgruppen basiert auf den bereits erwähnten Nitrobenzylderivaten und schon in den 1960er Jahren wurde über die lichtinduzierte Abspaltung von CO₂ aus Nitrophenylacetaten berichtet [169, 170].

Allerdings wurde bis heute kein System zur Photoaktivierung von CO₂ etabliert, dementsprechend würde *caged CO₂* die Untersuchung vieler Prozesse erstmalig ermöglichen. Die Idee das Nitrophenylacetat für diesen Zweck einzusetzen stammt von Dr. Georg Wille vom Institut für Biophysik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt. Es stellte sich also die Frage nach der generellen Eignung für die Untersuchung biologischer Proben. Allgemein sollten geeignete *caged compounds* die folgenden Kriterien erfüllen [168]:

- saubere Photoreaktion mit hoher Quantenausbeute für den gewünschten Bindungsbruch
- Anregung möglichst bei $\lambda > 300$ nm (um Absorption durch die biologische Umgebung und deren Schädigung zu minimieren)
- möglichst keine Absorption des Photolyselichtes durch Nebenprodukte, keine schädlichen Nebenreaktionen
- schnelle Aktivierung bei zeitaufgelösten Untersuchungen
- Löslichkeit im interessierenden Medium (im Allgemeinen: Wasser)
- Inaktivierung der geschützten Substanzen vor der Photolyse und hinreichende Stabilität ohne Bestrahlung

In Hinblick auf die geplanten zeitaufgelösten Messungen CO₂-aktivierter enzymatischer Reaktionen waren diese Fragen vorab zu klären. Insbesondere sollte mit Ultrakurzzeitspektroskopie im MIR getestet werden, auf welcher Zeitskala die Freisetzung des Kohlenstoffdioxids erfolgt und ob ggf. Nebenreaktionen oder Intermediate auf kurzen Zeitskalen zu beobachten sind.

Es ergibt sich die Möglichkeit der direkten Beobachtung eines Reaktionsproduktes ohne störende Überlagerung durch Absorptionen anderer Spezies. Somit stellen die Isomere des NPA ein Modellsystem dar, an dem der Einfluss der Konstitution auf die ablaufende Photodissoziation hervorragend untersucht werden kann. Deshalb wurden alle drei Isomere untersucht – auch wenn eine Anwendung als *caged* CO₂, z. B. wegen geringer Quantenausbeute im Falle von o-NPA, nicht in Frage kam. Der Vergleich der Ergebnisse soll Antworten auf die noch immer ungeklärte Frage nach dem Mechanismus der Photoreaktion der Nitrobenzyllderivate liefern.

4.2 Photochemie der Nitrophenylacetate

Nitroaromatische Verbindungen werden im Allgemeinen als nicht fluoreszierend beschrieben, was auf eine extrem schnelle Deaktivierung des emittierenden Zustands hindeutet. Die Ursache ist häufig eine schnelle und effiziente Interkombination, also der Übergang vom Singulett- in das Triplettssystem. Dieser Wechsel der Multiplizität wird durch die freien Elektronen des Stickstoffs begünstigt und geht mit einer Änderung der Elektronenkonfiguration einher ($n\pi^* \leftrightarrow \pi\pi^*$) [171].

Bei kleinen Aromaten kann es zu einer quantitativen Deaktivierung des angeregten Singulettzustands kommen [60, 172], wie die folgenden Beispiele zeigen. Für Nitrobenzol in Isopropanol wurde durch Triplettenergietransfer auf *cis*-1,3-Pentadien eine Triplettausbeute von etwa 0,7 bestimmt [173]. Mittels zeitaufgelöster *transient grating*-Spektroskopie erhielt man für Nitrobenzol und Nitrotoluol in Ethanol Werte von $\approx 0,8$ und für Nitrophenol in Benzol 0,86 [174, 175]. Die Interkombination ist dabei extrem schnell: Für Nitrobenzol wird eine Zeitkonstante von $\leq 0,1$ ps für den $S_1 \rightarrow T_2$ -Übergang und eine Triplettlebensdauer von etwa 0,5 ns angegeben, während ein Prozess innerhalb einiger Pikosekunden der $T_2 \rightarrow T_1$ Relaxation zugeordnet wird [175]. Die mittlere Komponente von 5 ps wurde ebenfalls mit transienter Absorption im sichtbaren Spektralbereich beobachtet und ebenso interpretiert. Die Zeitauflösung reichte für die Detektion des ISC jedoch nicht aus [176]. Auch die Untersuchung verschiedener polyzyklischer Nitroaromaten mittels Fluoreszenzaufwärtskonvertierung ergab biexponentielle Kinetiken mit extrem kurzen Lebensdauern [177]. Die kürzere Zeitkonstante lag im Subpikosekundenbereich, bei z. T. nur 50 fs, und wurde der Interkombination zugeschrieben, die längere im Bereich einiger Pikosekunden der Deaktivierung des S_1 -Zustands über andere Prozesse.

Eine Besonderheit bilden die *ortho*-Nitrobenzyllderivate: bei geeigneter Substitution kann der angeregte Singulettzustand durch einen Protonentransfer extrem schnell relaxieren und die Triplettausbeute ist wesentlich geringer [178]. Diese Verbindungen spielen als photolabile Schutzgruppen eine besondere Rolle und wurden bereits vielfältig untersucht [178–185].

Die Photochemie der Nitrophenylacetate wurde bereits 1969 von Margerum und Petrusis untersucht [170]. Durch qualitative und quantitative Analyse wurden die stabilen Reaktionsprodukte nach der Photolyse bestimmt und mittels Blitzlichtphotolyse konnten die transienten *aci*-Nitrobenzyle von o-NPA und p-NPA spektral aufgelöst werden. Die

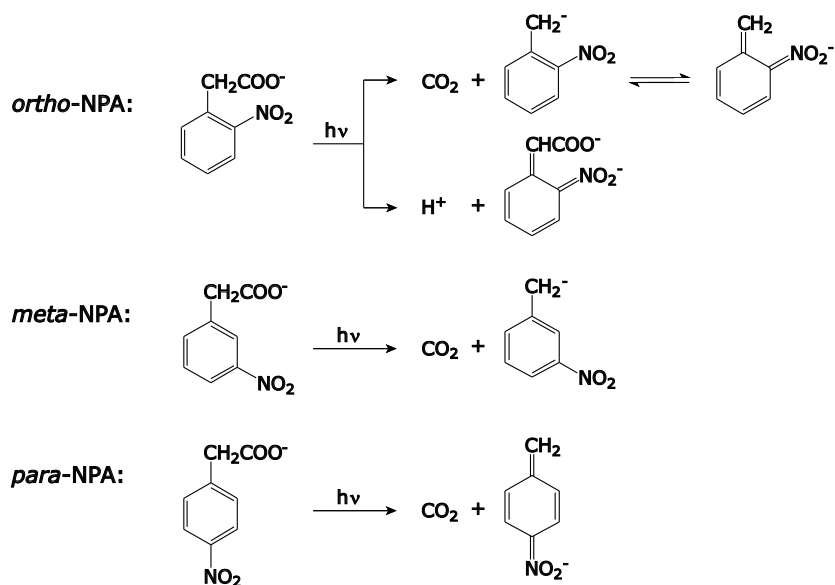


Abbildung 4.1: Strukturen der Konstitutionsisomere des NPA und ihre Photodecarboxylierungsreaktionen nach [170]. Für *o*-NPA ist die Resonanzstabilisierung des Nitrobenzylanions durch die *aci*-Nitrostruktur dargestellt, diese ergibt sich ebenfalls für *p*-NPA, aber nicht für *m*-NPA.

wesentlichen Produkte bzw. Intermediate sind in Abbildung 4.1 dargestellt und im Folgenden werden die wichtigsten Fakten dieser Reaktionen zusammengefasst:

Allgemein gilt, dass die Photodecarboxylierung nur in den deprotonierten Spezies auftritt, aber nicht in den korrespondierenden Nitrophenylessigsäuren. Ebenso wurde in nicht-wässrigen Lösungsmitteln (Ethanol, Essigsäure, Pyridin, Acetonitril) keine signifikante Bildung von CO₂ beobachtet. Für Lösungen der verschiedenen Isomere in wässriger NaOH bei pH = 10 und eingesetzten Konzentrationen von $c_0 < 40 \mu\text{M}$ erhielten Margerum und Petrusis folgende Produkte und Ausbeuten:

ortho-NPA Der Hauptreaktionspfad ist eine reversible Deprotonierung nach einem intramolekularem Protonentransfer. Die Quantenausbeute der Photodecarboxylierung beträgt 0,04 und das stabile Hauptprodukt der Photolyse ist *ortho*-Nitrotoluol. Das transient auftretende *ortho*-Nitrobenzylanion wurde spektroskopisch mit Blitzlichtphotolyse im UV/Vis-Bereich untersucht: das Absorptionsmaximum liegt bei 408 nm und die Lebensdauer bei 830 ms.

meta-NPA Die Photolyse führt direkt zur Eliminierung von CO₂. Es wurden keine transienten Intermediate gefunden. Das steht im Einklang mit der Tatsache, dass hier keine Resonanzstabilisierung durch eine *aci*-Nitro-Struktur möglich ist. Die Quantenausbeute wurde zu 0,63 bestimmt. Als stabiles Photoprodukt entsteht 3-Nitrotoluol.

para-NPA Die Photodecarboxylierung erfolgt mit einer Quantenausbeute von 0,59 und

erzeugt direkt das resonanzstabilisierte *aci*-4-Nitrobenzylanion mit einer Lebensdauer von 53 s. Als stabiles Hauptreaktionsprodukt entsteht 4,4'-Dinitrobenzyl bzw. bei geringeren Konzentrationen, erniedrigtem pH-Wert und verminderter Lichtintensität auch vermehrt 4-Nitrotoluol.

Studien durch Wan und Muralidharan an verschiedenen Nitroaromaten haben ergeben, dass eine Reaktion vom photo-Retro-Aldol-Typ zugrundeliegt [186]. Der erste Schritt ist dabei stets der heterolytische Bruch der C–C-Bindung und dieser erfordert eine besondere Stabilisierung des abgespaltenen Nitrobenzylcarbanions. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Katalyse durch Wasser bzw. Hydroxidionen eine wichtige Rolle spielt und dass diese Reaktion aus dem Triplettzustand heraus erfolgt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Triplettzustand auch für die Photochemie der Nitrophenylacetate eine wichtige Rolle spielt.

Die durchgeführte Untersuchung der Reaktionen aller Isomere mittels Ultrakurzzeit-spektroskopie im MIR-Bereich konzentriert sich auf den Bereich der Absorptionsbande von gelöstem CO₂ und erlaubt erstmals die direkte Beobachtung eines primären Reaktionsproduktes. Auf diese Weise lassen sich neue Einblicke in die ersten Schritte dieses wichtigen Reaktionstyps gewinnen, da die Dissoziation hier mit höchster Zeitauflösung anhand der Abspaltung des Kohlenstoffdioxids beobachtet werden kann. Ein besseres Verständnis der lichtinduzierten Reaktionsdynamik der Nitrobenzyl-derivate ist insbesondere für die Entwicklung neuer oder die Verbesserung bereits etablierter *caged compounds* erforderlich.

4.3 Ergebnisse der Ultrakurzzeitexperimente

Im Folgenden werden die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente präsentiert. Zunächst werden für alle Proben die Messbedingungen und am Beispiel von m-NPA die in den transienten Spektren auftretenden Effekte sowie die Verarbeitung der Datensätze vorgestellt. Die quantitative Auswertung erfolgt dann mittels der globalen Analyse für *meta*-, *ortho*- und *para*-NPA. Abschließend werden die Ergebnisse miteinander verglichen und anhand eines einfachen Reaktionsmodells diskutiert.

4.3.1 Messbedingungen

Sämtliche Messungen wurden mit der Durchflusszelle mit 50 μm Schichtdicke durchgeführt. Die wässrigen Lösungen mit 20 mM NPA und 100 mM Natriumphosphatpuffer (NaPi, pH = 8,5) wurden in dem geschlossenen Probenkreislauf von der Peristaltikpumpe umgewälzt. Der basische pH-Wert des Puffers ist wichtig für die Gleichgewichtslagen der vorhandenen Carbonsäuren: Das NPA liegt überwiegend als reaktives Acetat und nicht als Nitrophenylelessigsäure vor. Für das gelöste CO₂, bzw. die Kohlensäure ($\text{pK}_\text{S} = 6,5$), liegt das Gleichgewicht bei einem pH-Wert von 8,5 deutlich auf der Seite des deprotonierten Hydrogencarbonats (99 %). Die hohe Pufferkapazität garantiert einen stabilen pH-Wert und das Abfangen des freigesetzten CO₂ aus der Lösung. Auf diese Weise bleiben die Bedingungen konstant und Artefakte durch die im Laufe der Messung erhöhte Konzentration an CO₂ werden vermieden.

Da die Photodecarboxylierung irreversibel ist, wurde ein großes Probenvolumen von ca. 200 ml vorgelegt, so dass die Erniedrigung der Eduktkonzentration während der Messung vernachlässigt werden kann. Dies wurde durch Vergleich der Einzelmessungen zu Beginn und am Ende der Messreihe verifiziert, die im Rahmen der Messgenauigkeit identisch waren. Die mögliche Anregung von Photoprodukten braucht ebenfalls nicht berücksichtigt werden, da die Wahrscheinlichkeit ihrer Anregung bei den gegebenen Anregungswellenlängen und Produktkonzentrationen sehr klein ist. Vor allem aber erzeugt die Photolyse der stabilen Produkte kein weiteres CO₂ und somit auch keine Absorptionsänderungen im Bereich der Absorptionsbande von gelöstem CO₂ bei 2343 cm^{-1} .

Angeregt wurden die Proben entweder bei 290 nm (SFG) oder bei 258 nm (THG) in der Hauptabsorptionsbande mit unterschiedlichen Pulsenergien. Die Spektren der Anregungspulse sowie die Absorptionsspektren der drei Isomere sind in Abbildung 4.2(a) dargestellt. Die Absorptionsbanden zeigen keine ausgeprägte Schwingungsfinestruktur, besitzen auf der langwelligen Seite jedoch sehr breite Flanken und im Fall von o-NPA eine zusätzliche Schulter. Eine eindeutige Bandenzuordnung, die eine Interpretation dieser spektralen Charakteristika erlauben würde, existiert derzeit noch nicht.

In Abbildung 4.2(b) ist das FTIR-Differenzspektrum nach der Photolyse von m-NPA gezeigt. Dafür wurde das FTIR-Spektrum der nicht angeregten Probe von dem etwa 20 ms nach der Photolyse durch einem Excimer-Laserpuls bei 308 nm aufgenommenen FTIR-Spektrum abgezogen. Diese Messung wurde von Gabriela Schäfer am Institut für Biophysik der Johann Wolfgang Goethe-Universität mit einem modifizierten IFS 66 (V/S)

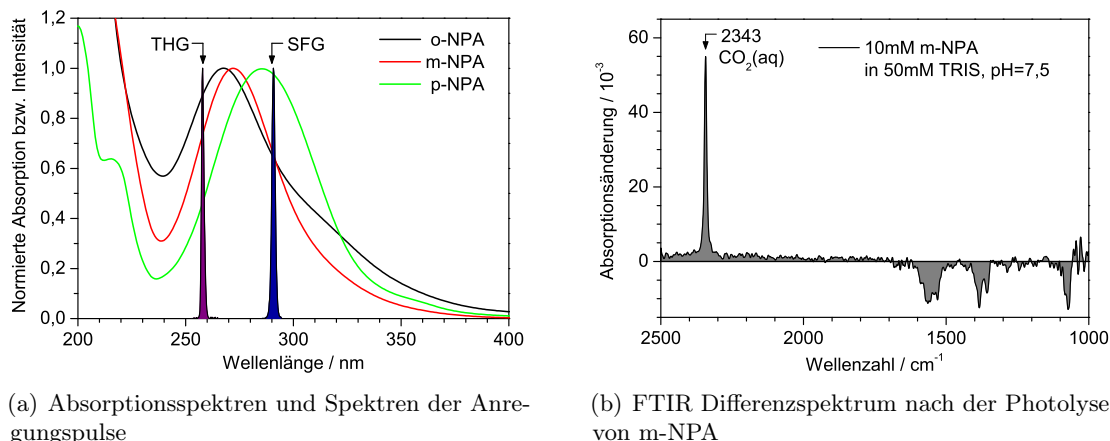


Abbildung 4.2: Normierte UV/Vis-Absorptionsspektren der drei Isomere des NPA (a). Ebenfalls eingezeichnet sind die Spektren der Anregungspulse die bei 290 nm mittels SFG aus NOPA und Laserfundamentale und bei 258 nm mittels THG erzeugt wurden. In (b) ist das Photolyse-Differenzspektrum von m-NPA 20 ms nach der Anregung bei 308 nm in einer Küvette mit 10 μm Schichtdicke gezeigt. Die positive Produktbande bei 2343 cm^{-1} ist gelöstem CO_2 zuzuordnen, die negativen Signale entsprechen ausgebleichten Schwingungsbanden des Eduktes. Dieses Rapidscan-FTIR-Differenzspektrum wurde freundlicherweise von G. Schäfer zur Verfügung gestellt, weitere Details finden sich in [187].

Rapidscan-FTIR-Spektrometer (Bruker Optik, Ettlingen) durchgeführt, weitere Details finden sich in [187]. Die Produktbande bei 2343 cm^{-1} kann eindeutig der Absorption des im Puffer gelösten CO_2 zugeordnet werden. Diese Bande ist spektral deutlich von denen der Edukte getrennt, die nach der Dissoziation ausgebleichten Schwingungsbanden befinden sich bei Wellenzahlen $< 1600\text{ cm}^{-1}$. In den Kurzzeitexperimenten wurde im Spektralbereich von etwa 2375 cm^{-1} bis 2280 cm^{-1} abgetastet (Gitter 1), so dass die Absorption des entstehenden CO_2 direkt beobachtet werden kann.

Die Polarisierungen von Anregungs- und Abtastlicht waren senkrecht zueinander orientiert, da keine geeignete Verzögerungsplatte für das Anregungslicht verfügbar war und eine Auswertung der Anisotropie für das abgespaltene CO_2 keinen Zusatznutzen erwarten lässt. Unter diesen Bedingungen ist zudem eine deutlich geringere Amplitude der Kreuzphasenmodulation zu erwarten.

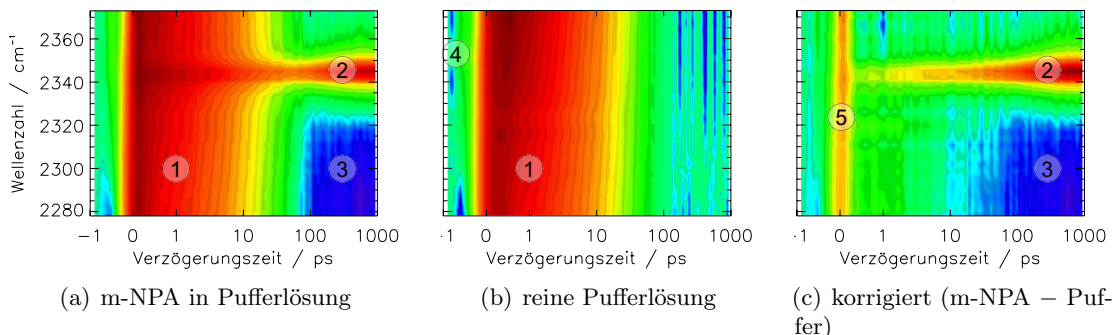


Abbildung 4.3: Transiente Absorptionsänderung von m-NPA und der Pufferlösung sowie das für Lösungsmittelbeiträge korrigierte transiente Differenzspektrum von m-NPA. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. Die Farbskala wird für jede Grafik einzeln wie folgt erzeugt: negatives Minimum: blau, Null: grün, positives Maximum: rot, alle anderen Werte werden interpoliert. Die auftretenden Effekte werden im Text diskutiert und sind wie folgt nummeriert: 1) Erzeugung von Ladungsträgern im CaF₂-Substrat 2) Absorption des freigesetzten CO₂ 3) Ausbleichen einer Absorptionsbande des Wassers 4) Kohärente Effekte durch gasförmiges CO₂ 5) kurzlebige NPA-Signal

4.3.2 Auftretende Effekte am Beispiel von m-NPA

Neben den Differenzbanden, die der Produktbildung und somit der Dissoziation zuzuordnen sind, treten eine Reihe weiterer Signale auf. Diese Effekte sollen zunächst am Beispiel einer Messung von m-NPA vorgestellt werden, es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die im Folgenden diskutierten Effekte bei allen durchgeführten Experimenten – auch der übrigen Isomere – beobachtet werden.

In Abbildung 4.3(a) sind die gemessenen transienten Absorptionsänderungen der m-NPA-Lösung nach Anregung bei 290 nm mit 750 nJ Pulsenergie als 2d-Grafiken dargestellt. Die Amplituden sind farbkodiert: das Minimum der negativen Absorptionsänderung ist blau, konstante Absorption ist grün und das Maximum der positiven ist rot eingefärbt. Die übrigen Werte werden interpoliert. Aufgrund der für jede Grafik individuell erzeugten Farbskala sind die verschiedenen Grafiken nicht direkt miteinander vergleichbar. Beispielsweise sind die kleinen negativen Signale vor dem Zeitnullpunkt nur in der Messung des reinen Puffers sichtbar (Bereich 4 in Abb. 4.3(b)), da ihre Amplitude wesentlich kleiner ist, als die der Bleichbande bei positiven Zeiten (Bereich 3 in Abb. 4.3(a)). Für den quantitativen Vergleich der Signale sind in Abbildung 4.4 die Transienten ausgewählter Wellenzahlen gezeigt.

Die transienten Spektren werden bis etwa 10 ps durch eine wellenzahlunabhängige, positive Absorptionszunahme (1) dominiert, die auf die Erzeugung von Ladungsträgern in den CaF₂-Küvettenfenstern zurückzuführen ist und auch bei der Messung des reinen Puffers beobachtet wird. Bei 2345 cm⁻¹ zeigt sich die Absorption des durch die Photolyse freigesetzten CO₂ (2). Ab ca. 100 ps tritt für Wellenzahlen unterhalb von 2320 cm⁻¹ eine negative Bande auf (3), die dem Bleichsignal einer Absorptionsbande des Wassers

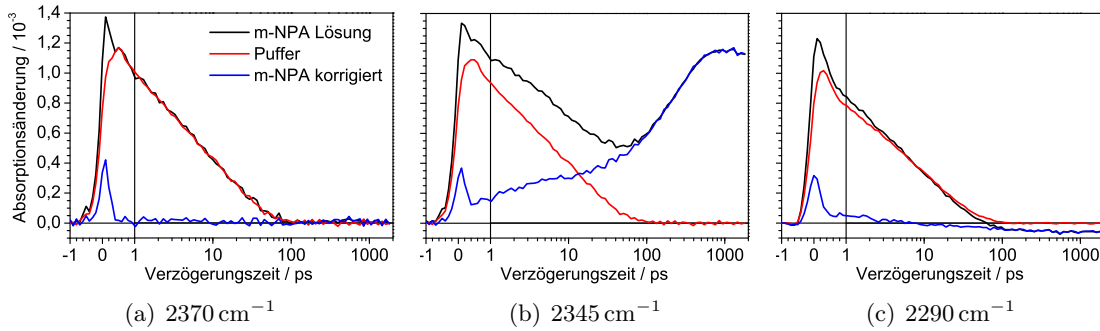


Abbildung 4.4: Transienten ausgesuchter Wellenzahlen der Rohdaten von m-NPA, der Pufferlösung und des korrigierten m-NPA-Signals. Die Signale der Pufferlösung wurden mit dem Faktor 0,64 skaliert und für die Korrektur vom Datensatz der Probe abgezogen. Bei 2370 cm^{-1} ist das Signal der Ladungsträger im CaF_2 -Substrat nicht durch weitere Effekte überlagert, hier wurde der Normierungsfaktor bestimmt. Bei 2345 cm^{-1} ist die zusätzliche Absorption durch das freigesetzte CO_2 und bei 2290 cm^{-1} das Bleichsignal einer Absorptionsbande des Wassers nach etwa 10 ps zu erkennen.

entspricht. Vor dem Zeitnullpunkt lassen sich um 2350 cm^{-1} Signale erkennen, die durch die kohärente Absorption der infraroten Abtastpulse durch gasförmiges CO_2 im Strahlengang entstehen (4). Nach Subtraktion der Puffersignale erhält man die korrigierten m-NPA-Daten, diese weisen eine kurzlebige, sehr breitbandige, positive Absorptionsänderung infolge der Anregung des m-NPA auf (5). Die spektrale Signatur einer Kreuzphasenmodulation ist nicht zu erkennen, was vermutlich in den senkrecht eingestellten Polarisationen von Anregungs- und Abtastlicht sowie den sehr großen Differenzsignalen begründet ist.

Erzeugung von Ladungsträgern im CaF_2 -Substrat

Am Zeitnullpunkt kommt es im gesamten Spektralbereich sowohl bei der Messung der Probenlösung als auch des reinen Puffers zu einer Absorptionzunahme um etwa 1×10^{-3} (Bereich 1 in Abb. 4.3). Der Anstieg dieses Signals ist nur wenig langsamer als die Kreuzkorrelationszeit von Anreg- und Abtastpuls von 300 fs und es zerfällt biexponentiell mit Zeitkonstanten von etwa 1,5 ps und 20 ps.

Weitere Messungen an einem einzelnen, 2 mm dicken CaF_2 -Substrat mit Anregungswellenlängen von 258 nm zeigen, dass die Küvettenfenster diesen Effekt verursachen. Abbildung 4.5(a) und 4.5(b) zeigt die 2d-Grafiken der im CaF_2 -Substrat induzierten Absorptionsänderungen für zwei verschiedene Anregungsintensitäten. Diese Spektren wurden ohne Änderung des optischen Strahlenganges direkt nacheinander aufgenommen, ein zusätzlicher Auskoppelspiegel mit 50 % Reflektivität bei 258 nm diente zur Halbierung der Anregungsintensität bei der zweiten Messung. Wie in den Transienten bei 2370 cm^{-1} zu erkennen ist, erhält man dieselbe Kinetik, wobei sich die Amplituden um einen Faktor von 5,25 unterscheiden. Dass dieser Faktor global auf alle Kanäle anwendbar ist, wird beim Vergleich der transienten Spektren nach 1 ps deutlich (Abb. 4.5(f)).

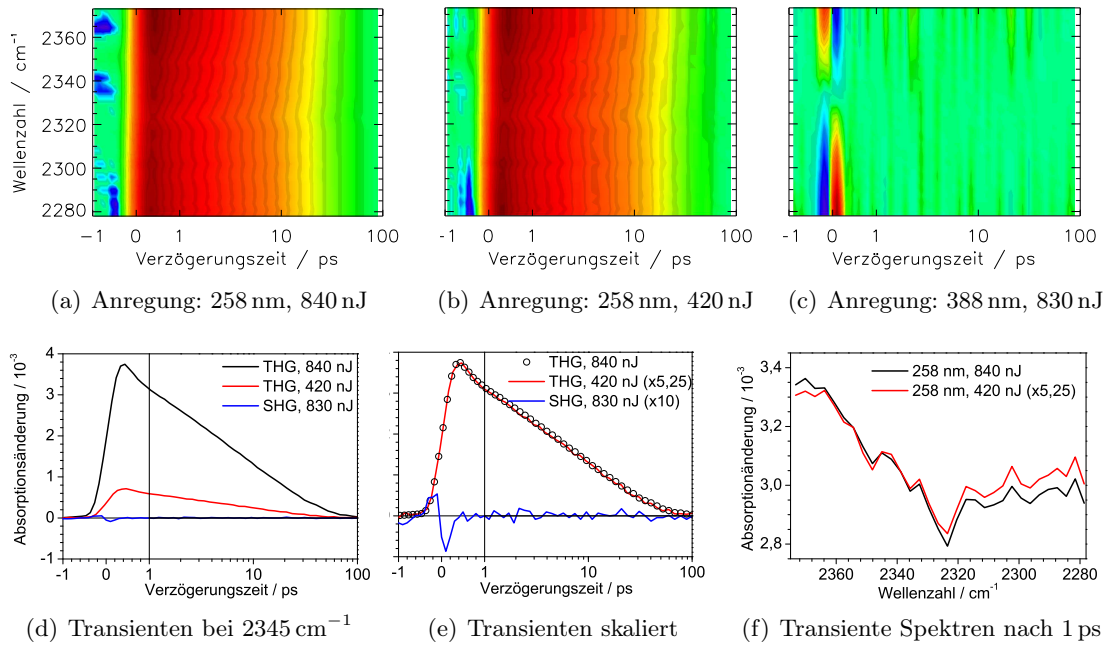


Abbildung 4.5: Transiente Absorptionsänderungen eines 2 mm dicken CaF₂-Fensters nach Anregung bei 258 nm und 388 nm mit unterschiedlichen Pulsenergien (oben) und die einzelnen Transienten bei 2345 cm⁻¹ (unten). Die bei 258 nm angeregten Signale zeigen dieselbe Kinetik und unterscheiden sich nur in ihrer Amplitude um den Faktor 5,25, wie die transienten Spektren nach 1 ps belegen (f). Bei 388 nm tritt nur das XPM-Signal von Anreg- und Abtastpuls auf (Abb. (c), vgl. Abb. 3.18, S. 67), aber nicht die nach Anregung bei 258 nm beobachtete Kinetik.

Die Amplitude des auftretenden Signals ist somit nicht proportional zur Energie der Anregungspulse, die Abhängigkeit weist auf einen quadratisch mit der Anregung skalierenden Zweiphotoneneffekt hin. Die Abweichung vom erwarteten Faktor 4 erklärt sich mit der Nichtlinearität dieses Prozesses, da sich weder die Anregungsintensität, noch der räumliche Überlapp von Anregungs- und Abtastfokus über die Dauer beider Experimente exakt konstant halten ließ. Zudem könnte der eingebaute Auskoppelspiegel zu einem geringen Strahlversatz und zusätzlicher Dispersion geführt haben. Überdies kann auch eine Degradation des Substrates nicht ausgeschlossen werden.

Eine Zweiphotonenabsorption würde hier Wellenlängen von 145 nm (SFG) bzw. 129 nm (THG) und somit der bei etwa 130 nm einsetzenden Absorption von CaF₂ entsprechen. Insofern stellt sich die Frage, ob es zu einer Anregung von Elektronen ins Leitungsband also zur Erzeugung freier Ladungsträger kommt, oder ob eine exzitonische Anregung stattfindet, bei der die Elektronen-Loch-Paare noch schwach aneinander gebunden sind. Es ist ebenfalls möglich, dass es durch das intensive Anregungslicht zur Erzeugung von Farbzentren im Material kommt [188]. In jedem Fall würde das Signal die Dynamik der Elektron-Loch-Paare bzw. deren Rekombination wiedergeben.

Die These der Anregung von Farbzentren bzw. Ladungsträgern durch Zweiquantenab-

sorption im CaF₂-Substrat wird nach vergleichbaren Messungen mit Anregung bei 388 nm (SHG) weiter bestätigt. Diese wurden sowohl mit paralleler, als auch mit senkrechter Polarisation von Anreg- und Abtastlicht ausgeführt. Jedoch wurde keine vergleichbare Kinetik gefunden, wie die Transienten in Abb. 4.5 zeigen, auch nicht bei Anregung mit sehr hohen Pulsenergien von bis zu 1,8 μJ . Das XPM-Signal bestätigt die korrekte Einstellung aller Parameter. Die Energie der korrespondierenden Wellenlänge von 194 nm bei Zweiphotonenabsorption der SHG ist nicht ausreichend für die Erzeugung von Exzitonen oder die Anregung von Elektronen ins Leitungsband.

Probe und reine Pufferlösung wurden stets direkt nacheinander unter denselben Bedingungen gemessen und für den reinen Puffer wurde immer ein wesentlich größeres Ladungsträgersignal gefunden. Dieser Befund erklärt sich durch die Absorption des Anregungslichtes in der Probe und die damit verbundene geringere Intensität beim Durchgang durch das zweite Küvettenfenster. Nach einer entsprechenden globalen Skalierung mit einem Faktor f , die für jede Messreihe einzeln durchgeführt wird, kann das Signal subtrahiert werden. Das liefert durchweg gute Ergebnisse, da die übrigen Differenzbanden schmalbandiger sind, die Ladungsträgerdynamik nicht durch Probe oder Puffer beeinflusst wird und weiter keine Störungen mit vergleichbarer Amplitude auftreten (vgl. Abb. 4.3 und 4.4). Die resultierenden transienten Differenzspektren $\Delta A^{\text{korrr}}(\tilde{\nu}, t) = \Delta A^{\text{Probe}}(\tilde{\nu}, t) - f\Delta A^{\text{Puffer}}(\tilde{\nu}, t)$ werden im Folgenden als *korrigiert* bezeichnet.

Absorption des freigesetzten CO₂

Bei 2345 cm^{-1} erkennt man das Anwachsen einer schmalbandige Absorptionsbande (Bereich 2 in Abb. 4.3). In Abbildung 4.6(a) ist das transiente Differenzspektrum nach 1,8 ns zusammen mit dem FTIR-Differenzspektrum nach 20 ms aufgetragen. Die Wellenzahlen der Maxima beider Differenzbanden sind im Rahmen der spektralen Auflösung von einem Kanal ($\Delta\tilde{\nu} \approx 3 \text{ cm}^{-1}$) identisch. In Anbetracht der unterschiedlichen Messmethoden und -bedingungen zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung, somit kann dieses Signal der Absorption von gelöstem CO₂ nach der Dissoziation zugeordnet werden.

In den korrigierten transienten Differenzspektren lässt sich die Signatur des CO₂ bereits direkt nach der Anregung nachweisen, sie erreicht nach ca. 1 ns einen konstanten Wert (Abb. 4.4(b)). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Photodecarboxylierungsreaktion von m-NPA sehr schnell erfolgt und nach ca. 1 ns abgeschlossen ist, eine quantitative Analyse wird später präsentiert.

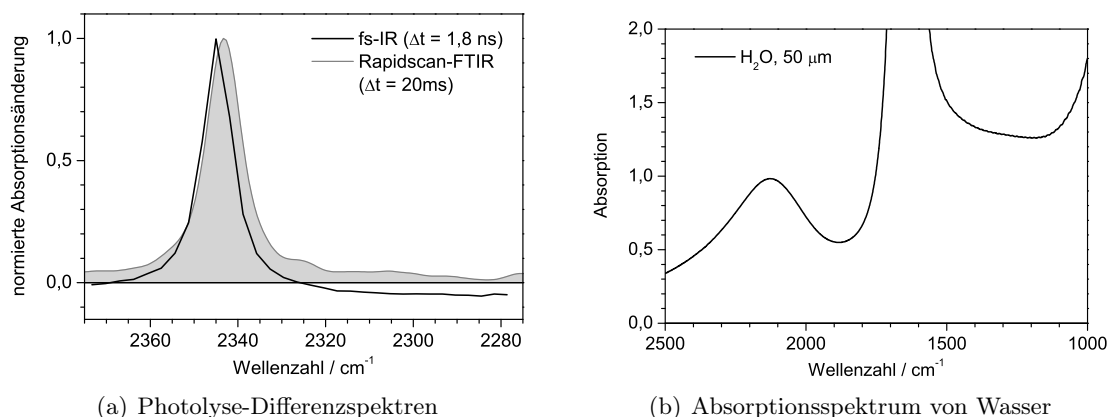


Abbildung 4.6: (a) Vergleich des transienten Differenzspektrums der Kurzzeitmessung mit der Rapidscan-FTIR-Messung (vgl. Abb. 4.2(b), S. 79). In Anbetracht der unterschiedlichen Methoden und Messbedingungen zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung. (b) Absorptionsspektrum von reinem Wasser der Schichtdicke 50 μm.

Ausbleichen der Absorptionsbande des Wassers

Ab etwa 10 ps wird in den korrigierten Differenzspektrums eine negative Absorptionsänderung für Wellenzahlen unterhalb von 2320 cm⁻¹ sichtbar (Bereich 3 in Abb. 4.3). Diese negative Bande wird unabhängig von der Konstitution in allen transienten Differenzspektrums von NPA beobachtet, aber nicht in denen des reinen Puffers. Ihre Amplitude ist – im Rahmen der Messgenauigkeit – proportional zur Pulsenergie der Anregung. Da in der Rapidscan-FTIR-Messung kein vergleichbares Bleichsignal aufgelöst wird (Abb. 4.6(a)), ist eine nach der Dissoziation ausgebleichte Schwingungsbande des m-NPA als Ursache auszuschließen. Die Kinetik dieses Signals ist zwar bei kurzen Zeiten nicht mit der der CO₂-Absorptionsbande identisch, nach 1 ns wird jedoch auch hier ein stationärer Wert erreicht.

Die spektrale Form und Position dieses Signals sowie seine Kinetik deuten auf das Ausbleichen einer Lösungsmittelbande hin. Abbildung 4.6(b) zeigt das Absorptionsspektrum von reinem Wasser: bei 2125 cm⁻¹ liegt das Maximum der Kombinationsschwingungsbande (Librations- und Biegeschwingung) von H₂O [189]. Eine Temperaturerhöhung des Wassers führt hier zu einer Absorptionsabnahme und Rotverschiebung ihres Maximums [59], was mit der Beobachtung übereinstimmt. Nach der Absorption des UV-Lichtes wird nur ein Teil der Energie zum Spalten der Bindung benötigt. Die gesamte Überschussenergie wird letztendlich als Wärme an das Lösungsmittel Wasser abgegeben – auch bei solchen Reaktionspfaden, die nicht zur Freisetzung von CO₂ beitragen. Daher ist nicht zu erwarten, dass das Bleichsignal der Lösungsmittelbande derselben Kinetik folgt, wie das Freisetzen des CO₂.

Die Temperaturerhöhung kann grob abgeschätzt werden: Das angeregte Probenvolumen ergibt sich aus dem Radius von etwa 150×10^{-6} m des Anregungsfokus und der Schichtdicke von 50×10^{-6} m zu $3,5 \times 10^{-12}$ m³ was einer Wassermasse von $m = 3,5 \mu\text{g}$

entspricht. Die Absorption der Probe war bei der vorgelegten Konzentration: $A_{290} \approx 1$, es wurden also etwa 90 % oder $E_{h\nu} = 680$ nJ der Pulsenergie in diesem Volumen deponiert. Mit der Wärmekapazität von Wasser $C = 4,2 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$ berechnet sich der maximale gemittelte Temperaturanstieg bei vollständiger Umwandlung in Wärme zu:

$$\Delta T = \frac{E_{h\nu}}{mC} = \frac{680 \times 10^{-9}}{4,2 \times 3,5 \times 10^{-6}} \text{ K} \approx 50 \text{ mK} \quad (4.1)$$

Die Absorptionsbanden von Wasser wurden von Carsten Krejtschi über einen großen Temperaturbereich sehr detailliert untersucht [59]. Skaliert man die dort gemessenen Absorptionsänderungen entsprechend der hier zu erwarteten Erwärmung der Probe und der Schichtdicke der jeweils verwendeten Küvetten, dann kann auch die temperaturinduzierte Absorptionsänderung abgeschätzt werden: Danach sollte sich ein maximales Bleichsignal von $\Delta A \approx -0,2 \times 10^{-3}$ ergeben. Das ist mehr als dreimal so groß, wie das hier beobachtete Signal von etwa $\Delta A \approx -60 \times 10^{-6}$. Allerdings bleiben viele Faktoren hier unberücksichtigt: die Intensitätsverteilung ist inhomogen wegen des gaußförmigen Anregungsprofils und der in der Probe exponentiell abfallenden Intensität. Aufgrund der Photoreaktion wird nicht die gesamte Photonenenergie in Wärme umgewandelt und möglicherweise hat sich nach 1,8 ns noch kein Temperaturgleichgewicht eingestellt.

Trotz der starken Vereinfachung zeigt diese einfache Überschlagsrechnung, dass der Energietransfer an das Lösungsmittel Wasser zu einer signifikanten Aufheizung der Probe führt. Damit kann das beobachtete Bleichsignal auf die Temperaturabhängigkeit der Kombinationsschwingungsmode des Wassers bei 2125 cm^{-1} zurückgeführt werden.

Kohärente Pulsverformung durch gasförmiges CO_2

Im Bereich der CO_2 -Absorptionsbande ist bereits vor dem Zeitnullpunkt ein kleines Differenzsignal zu beobachten (Bereich 4 in Abb. 4.3). Dieses ist zwar in allen Datensätzen enthalten, ist aber in den 2d-Grafiken nur in Abwesenheit anderer Bleichsignale sichtbar.

In Abbildung 4.7(a) ist die Region der transienten Differenzspektren vor dem Zeitnullpunkt nach Anregung der Pufferlösung mit einer Wellenlänge von 258 nm und 700 nJ Pulsenergie vergrößert dargestellt. Man erkennt ein zu negativen Zeiten hin abnehmendes Differenzsignal mit deutlichen Oszillationen in der Zeit- und Frequenzdomäne. Da dieses Signal auch in den transienten Differenzspektren der CaF_2 -Scheibe auftritt (Abb. 4.5, kann es weder der Probe noch dem Lösungsmittel zugeordnet werden, obwohl seine Signatur dem gestörten freien Induktionszerfall ähnelt (vgl. Abb. 3.16, S. 63). Das zentrale Maximum dieses Signals stimmt innerhalb der spektralen Auflösung gut mit dem Bandenkopf der Absorption von gasförmigen CO_2 überein und unterscheidet sich deutlich von der Absorption des gelösten (Abb. 4.7(b)).

Ursache ist die Absorption des IR-Abtastpulses durch atmosphärisches CO_2 , welches trotz der Spülung des Abtaststrahlengangs mit gereinigter Luft noch in geringen Mengen vorhanden ist. Die so induzierte Polarisation emittiert ein kohärentes Lichtfeld und es kommt zur Veränderung der abfallenden Flanke des Abtastpulses. Das entspricht der durch Wasserdampf verursachten Störung vor dem Zeitnullpunkt, die Unterschiede

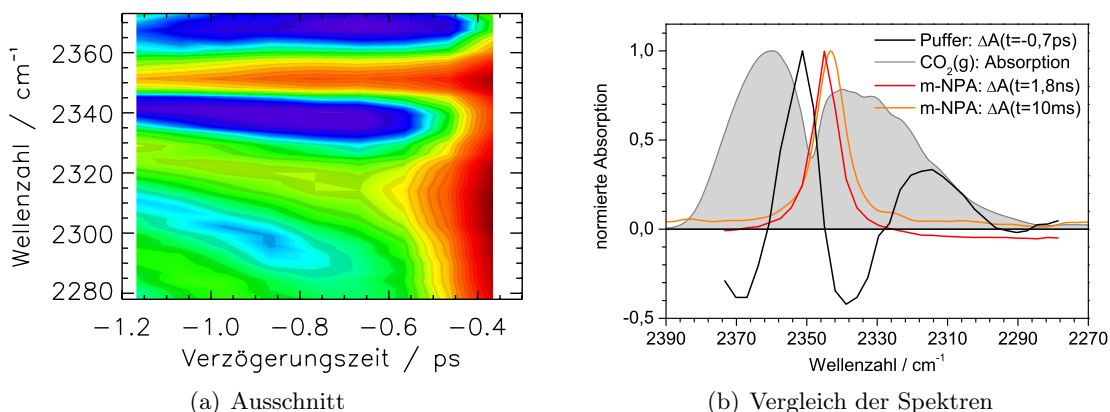


Abbildung 4.7: (a) 2d-Grafik der transienten Absorptionsänderung vor dem Zeitnullpunkt in der Pufferlösung nach Anregung bei 258 nm mit 700 nJ. In (b) ist das transiente Differenzspektrum bei $t = -0,7$ ps zusammen mit den entstehenden Absorptionsbanden von gelöstem CO₂ nach der fs-IR- bzw. der Rapidscan-FTIR-Messung dargestellt. Außerdem ist das Absorptionsspektrum von gasförmigen CO₂ in grau hinterlegt. Die rovibronische Feinstruktur wurde spektral nicht aufgelöst.

liegen vor allem im Abstand der Spektrallinien beider Gase begründet. Eine derartige Pulsverformung wurde bereits für CO₂ [142, 143] und andere Gase [144, 145] bei höheren Drücken eingehend untersucht. Die Dauer des Effektes ist auf wenige Pikosekunden beschränkt, er weist nur eine sehr geringe Amplitude auf und wird bei Abzug des Puffersignals teilweise kompensiert. Folglich kann die damit verbundene Störung der Daten bei dem gegebenen Signal-zu-Rausch-Verhältnis vernachlässigt werden.

Kurzlebige NPA-Signal

In allen korrigierten transienten Differenzspektren zeigt sich um den Zeitnullpunkt ein sehr breitbandiges positives Signal (Bereich 5 in Abb. 4.3) mit einer kurzen Lebensdauer im Bereich der Zeitauflösung der Apparatur von etwa 300 fs. Die globale Analyse ergibt, dass die Abklingdauer nach Anregung bei einer Wellenlänge 258 nm etwas größer ist als bei 290 nm (vgl. Tab. 4.1, S. 98). Auf Grundlage der derzeit vorliegenden Daten lässt sich noch keine eindeutige Erklärung bzw. Zuordnung geben, zumal der Signalverlauf wegen des überlagerten CaF₂-Signals mit einem größeren Fehler behaftet ist.

Es könnte sich um einen nichtlinearen optischen Effekt handeln, bei dem die kohärente Wechselwirkung von Anreg- und Abtastpuls in der Probe die Intensität des detektierten IR-Lichtes moduliert. Die Abhängigkeit der Abklingdauer von der Anregungswellenlänge würde den unterschiedlichen Kreuzkorrelationsbreiten entsprechen. Eine veränderte Instrumentenfunktion sollte sich jedoch auch in einem verlangsamten Anstieg der Absorption der im CaF₂ induzierten Ladungsträger bemerkbar machen. Das wird nicht beobachtet, so dass diese Möglichkeit unwahrscheinlich erscheint.

Theoretisch könnten solvatisierte Elektronen für dieses Signal verantwortlich sein, denn erste kurzzeitspektroskopische Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich weisen

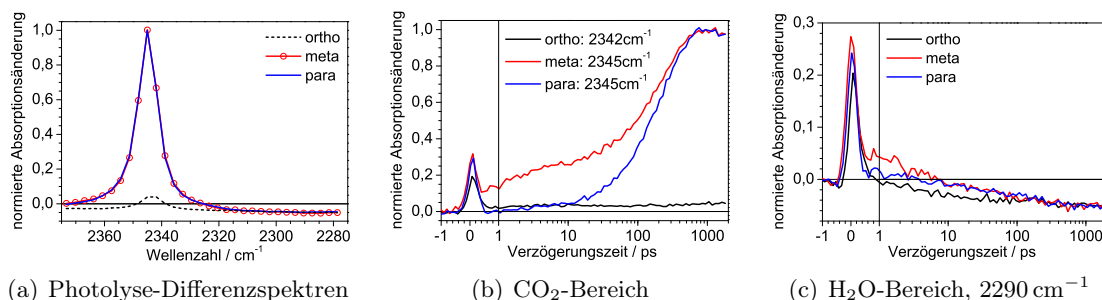


Abbildung 4.8: Vergleich der Photolyse-Differenzspektren der drei Isomere (a) sowie deren normierter Transienten im Bereich der CO_2 -Absorption (b) sowie bei 2290 cm^{-1} im Bereich der Bleichbande des Wassers. *meta*- und *para*-Daten wurden hinsichtlich der maximalen Produktabsorption normiert, stimmen jedoch im gesamten Bereich sehr gut überein. In Ermangelung einer vergleichbaren Markerbande wurde der *ortho*-Datensatz hinsichtlich der Bleichbande des Wassers skaliert. Dargestellt sind die folgenden Messungen: o-NPA: Anregung bei 258 nm mit 420 nJ , m-NPA: Anregung bei 290 nm mit 750 nJ , p-NPA: Anregung bei 290 nm mit 750 nJ .

auf ihre Entstehung hin [190]. Da sie durch Ionisierung des Wassers bei Anregung im UV erzeugt werden, sollten ihre Signaturen aber auch in den transienten Spektren des reinen Lösungsmittels auftreten [191]. Folglich können solvatisierte Elektronen das noch vorhandene Differenzsignal nach der Subtraktion der Daten der reinen Pufferlösung nicht erzeugen.

Als wahrscheinlichste Erklärung erscheint damit die breitbandige Absorption transient besetzter bzw. sehr kurzlebiger, elektronisch angeregter Zustände wie beispielsweise in transienten IR-Spektren von *para*-NitroAnilin [192, 193]. Zudem wurden vergleichbare Zeitkonstanten bereits für Nitrobenzol [175] und polyzyklische Nitroaromaten [177] gefunden und mit der Entvölkerung des angeregten Singulettzustands assoziiert. Daher wird dieses Signal tendenziell dem S_1 -Zustand zugeordnet.

4.3.3 Vergleich der Konstitutionsisomere und globale Analyse

Abbildung 4.8 zeigt den Vergleich der normierten zerfallassozierten Spektren zu $\tau_4 := \infty$, die den Photolyse-Differenzspektren entsprechen, sowie der ebenso normierten Transienten. Wegen der geringeren Photodecarboxylierungsquantenausbeute von *ortho*-NPA unterscheiden sich die Produktspektren deutlich. Auch die Transienten offenbaren generelle Unterschiede zwischen den drei Isomeren: z. B. ist bei *para*-NPA keine signifikante Freisetzung von CO_2 innerhalb der ersten Pikosekunden zu beobachten.

Diese Unterschiede werden im Folgenden im Rahmen der globalen Analyse quantitativ ausgewertet, wobei die Verarbeitung und Analyse der Daten bei allen Datensätzen dieselbe ist. Diese Auswertung und die Zuordnung der erhaltenen Zeitkonstanten wird zunächst detailliert anhand einer Messung von m-NPA erklärt, danach folgt die Präsentation der übrigen Untersuchungen.

meta-NPA

Anregung bei 290 nm mit 750 nJ Vor der globalen Analyse wurden die Daten hinsichtlich des dominanten Ladungsträgersignals korrigiert, indem ein amplitudenangepasster Datensatz der zugehörigen Puffermessung subtrahiert wurde. Die globale Anpassung wurde nach Gleichung 3.14 (S. 60) nur für die korrigierten Daten durchgeführt, wobei zusätzlich die Kreuzkorrelationsbreite $w(\tilde{\nu})$ und der Zeitnullpunkt $t_0(\tilde{\nu})$ für jeden Kanal optimiert wurden. Eine Zerfallszeit wird dabei stets auf den Wert *unendlich* ($\tau := \infty$) festgesetzt, um das zeitunabhängige Differenzsignal bei großen Verzögerungszeiten zu modellieren. In Abbildung 4.9 sind noch einmal die 2d-Grafiken des unkorrigierten und des korrigierten Datensatzes sowie der angepassten Zerfallsfunktion mit vier Zerfallszeiten dargestellt.

Eine optimale Beschreibung der Daten erhält man bei der Anpassung mit einer Summe aus vier exponentiellen Zerfallsfunktionen: Bei der Anpassung einer Zerfallsfunktion mit nur drei Zerfallszeiten ($\tau_1 = 0,05$ ps, $\tau_2 = 180$ ps, $\tau_3 := \infty$) zeigen sich systematische Abweichungen von den Daten, die die statistische Schwankung der Messwerte deutlich überschreiten. Das kann in Abbildung 4.9(e) und 4.9(f) durch den Vergleich der angepassten Zerfallsfunktionen mit drei bzw. vier Zeitkonstanten mit den Daten nachvollzogen werden. Diese Transienten geben die Absorptionszunahme durch Freisetzung von CO₂ bei 2345 cm⁻¹ und das Ausbleichen der Lösungsmittelabsorption bei 2290 cm⁻¹ infolge der durch die Photolyse induzierten Temperaturerhöhung von m-NPA wieder. Eine weitere Erhöhung der Parameteranzahl bei Verwendung von fünf Zeitkonstanten bringt hingegen keine signifikant verbesserte Anpassung.

Aus der globalen Analyse ergeben sich folgende Zeitkonstanten: $\tau_1 = 0,04$ ps, $\tau_2 = 3,7$ ps, $\tau_3 = 220$ ps und $\tau_4 := \infty$. Ihre zerfallenssoziierten Spektren finden sich in Abbildung 4.10 zusammen mit den mittels der nichtlinearen Kurvenanpassung optimierten Zeitnullpunkten $t_0(\tilde{\nu})$ und Kreuzkorrelationsbreiten $w(\tilde{\nu})$. Die Zeitnullpunkte weisen nur eine geringe lineare Dispersion von etwa $\Delta t_0 = 70$ fs zwischen 2375 cm⁻¹ und 2280 cm⁻¹ auf, die geringer ist als die Schrittweite von 100 fs im Bereich des Zeitnullpunktes. Der spektrale Verlauf der ermittelten Kreuzkorrelationsbreite $w(\tilde{\nu})$ ist stetig und liegt im Mittel bei etwa 350 fs. Offensichtlich spielen die Dispersion, die der Abtastpuls zwischen DFG-Erzeugung und Probenort erfährt, sowie sein Chirp bei der gewählten Abtastwellenlänge nur eine untergeordnete Rolle.

Die zerfallenssoziierten Spektren lassen sich anhand der charakteristischen Signaturen aus Abbildung 4.3 (S. 80) den in Abschnitt 4.3.2 diskutierten Prozessen zuordnen:

- Die Amplitude von τ_1 ist im gesamten Spektralbereich praktisch konstant und mit etwa 45×10^{-3} sehr groß, deshalb wurde sie für die Darstellung im Diagramm mit 0,2 multipliziert. Diese Komponente entspricht dem Zerfall des breitbandigen positiven Signals (Bereich 5 in Abb. 4.3), das der Absorption des S₁-Zustands zugeordnet wurde. Die Zeitkonstante $\tau_1 = 0,04$ ps beträgt nur 1/10 der Kreuzkorrelationsbreite ($w \approx 0,35$ ps), die aufgezeichnete Kinetik dieses positiven Signals wird also durch die Zeitauflösung der Apparatur bestimmt. Die Amplitude des zerfallenssoziierten Spektrums hängt deswegen stark von der angenommenen Instrumentenfunktion ab

und auch die mit der globalen Analyse ermittelte Zeitkonstante ist entsprechend fehlerbehaftet.

- Das zerfallassozierte Spektrum zu $\tau_2 = 3,7$ ps besitzt ein Minimum von -145×10^{-6} bei 2345 cm^{-1} und eine positive Amplitude von etwa 80×10^{-6} für Wellenzahlen $\tilde{\nu} < 2335 \text{ cm}^{-1}$ mit einer Nullstelle bei 2339 cm^{-1} . Die relativen Amplituden beider Bereiche unterscheiden also nur um einen Faktor von ≈ 2 , während dieses Verhältnis nach 1,8 ns bzw. im Produktspektrum von τ_4 bei 20 liegt. Mit der Annahme eines größeren Bleichsignals erklärt sich auch die Verschiebung der Nullstelle um fast 15 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen im Vergleich zum Produktspektrum. Diese Komponente trägt also sowohl zum Ausbleichen der breiten Absorptionsbande des Wasser, als auch zur Freisetzung von CO_2 bei. Sie repräsentiert jedoch nicht den Hauptreaktionspfad der Decarboxylierung.

Die Bedeutung dieser Zeitkonstante für die angepasste Zerfallsfunktion lässt sich in den Transienten in Abbildung 4.9 nachvollziehen. Beide weisen deutliche Signaländerungen auf der Zeitskala von Pikosekunden auf, die durch τ_2 modelliert werden. Bei 2290 cm^{-1} erkennt man einen Wendepunkt der Transiente nach etwa 10 ps, der die unterschiedlichen Zeitskalen der hier ablaufenden Prozesse verdeutlicht.

- Das zur Komponente $\tau_3 = 220$ ps assoziierte Spektrum besitzt ein Minimum bei 2345 cm^{-1} mit $-0,88 \times 10^{-3}$, eine Nullstelle bei 2325 cm^{-1} und eine positive Amplitude von 45×10^{-6} bei 2290 cm^{-1} . Es stellt nahezu ein verkleinertes Spiegelbild des Photoproduktspektrums dar und kann dementsprechend der Bildung dieses Produktes zugeordnet werden. Die Zunahme der CO_2 -Absorption wird eindeutig durch diese Zeitkonstante bestimmt, während sie für das Bleichsignal im Bereich von $\tilde{\nu} < 2325 \text{ cm}^{-1}$ einen geringeren Beitrag liefert als τ_2 . Auch diese Aussagen können mit den Transienten in Abbildung 4.9 verifiziert werden.
- Die letzte Zeitkonstante τ_4 wurde vor der globalen Anpassung auf den Wert ∞ festgesetzt um die Absorptionsänderung bei langen Verzögerungszeiten zu modellieren. Die gezeigten Transienten belegen, dass dieses Vorgehen berechtigt ist: ab 1 ns tritt praktisch keine Zeitabhängigkeit der gemessenen Absorptionsänderung mehr auf, es wird ein Zustand erreicht, der innerhalb der maximalen Verzögerungszeit von 1,8 ns als stationär anzusehen ist. Die Interpretation des Photoproduktspektrums wurde bereits gegeben: die positive Bande bei 2345 cm^{-1} entspricht der zusätzlichen Absorption durch das freigesetzte, gelöste CO_2 und die negative Bande bei $\tilde{\nu} < 2325 \text{ cm}^{-1}$ dem Ausbleichen einer Absorptionsbande des Wassers aufgrund der reaktionsinduzierten Temperaturerhöhung.

Offensichtlich stellt der mit $\tau_3 = 220$ ps verbundene Prozess den Hauptreaktionspfad der Photodecarboxylierung dar: etwa 75 % der Produktabsorption entsteht mit dieser Zeitkonstante. Der Anteil der schnelleren Komponente $\tau_2 = 3,7$ ps an der finalen CO_2 -Absorption ist nur etwa 13 %, diese liefert jedoch einen größeren Beitrag zur Temperaturerhöhung. Demzufolge stellt der τ_2 -Prozess einen Reaktionspfad dar, der zwar

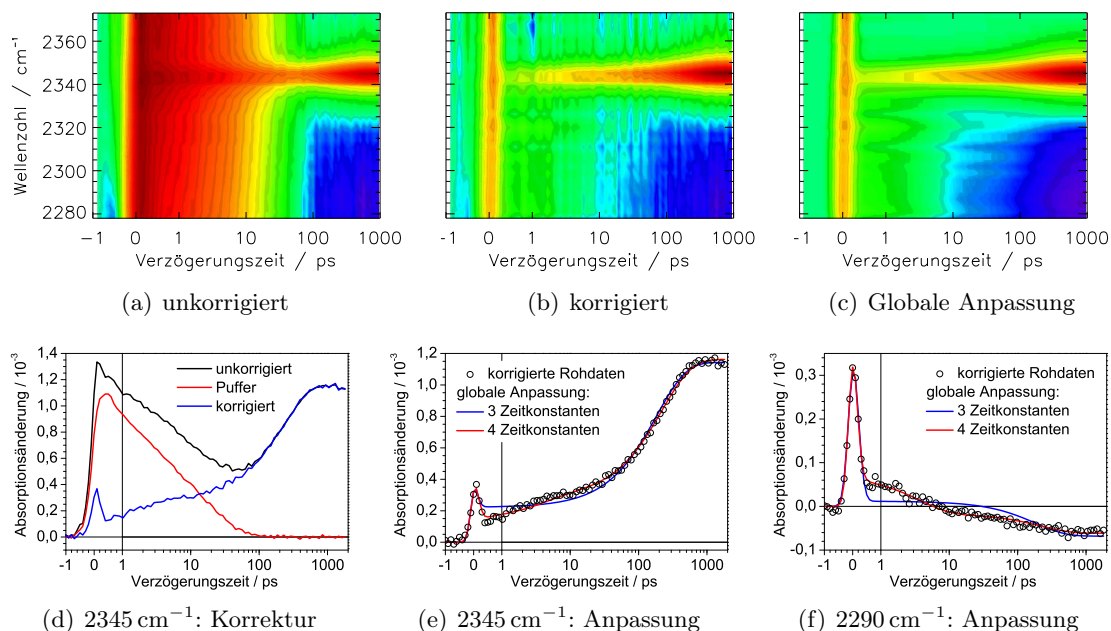


Abbildung 4.9: Globale Analyse der transienten Spektren von m-NPA nach Anregung bei 290 nm mit 750 nJ. Die 2d-Grafiken zeigen die unkorrigierten und korrigierten transienten Differenzspektren sowie das Ergebnis der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten. Die durchgeführte Korrektur durch Subtraktion des skalierten Puffersignals ist für die Wellenzahl der CO₂-Bande (2345 cm⁻¹) in (d) dargestellt. In (e) und (f) werden die korrigierten Daten mit den globalen Anpassungsfunktionen mit drei und vier Zeitkonstanten im Bereich der CO₂-Absorption und der Bleichbande des Wassers verglichen.

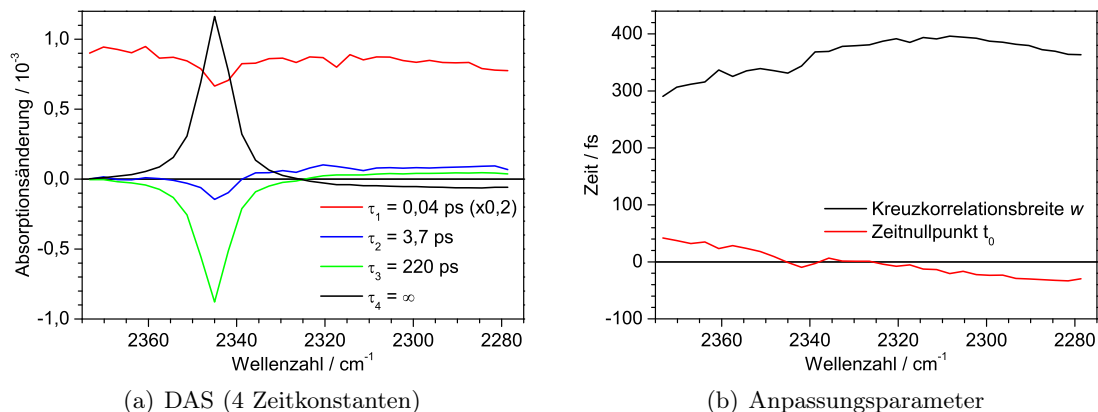


Abbildung 4.10: Zerfallassozierte Spektren von meta-NPA nach Anregung bei 290 nm mit 750 nJ für die optimale Anpassung mit vier Zeitkonstanten (a). Das Spektrum der Komponente τ_1 besitzt eine sehr große Amplitude und wurde für diese Abbildung mit einem Faktor von 0,2 multipliziert. In (b) sind die optimierten Anpassungsparameter für Zeitnullpunkt und Kreuzkorrelationsbreite dargestellt, die ebenfalls im Rahmen der globalen Analyse bestimmt wurden.

zu einer schnellen Energiedissipation an das Lösungsmittel, aber kaum zur Abspaltung von CO₂ führt. Bemerkenswert ist, dass bereits innerhalb der Kreuzkorrelationsbreite etwa 10 % der Produktabsorption gebildet werden, was auf die extrem schnelle Dissoziation des Moleküls innerhalb von 400 fs hinweist. Aufgrund der Überlagerung mit dem breitbandigen Signal zu τ_1 und der limitierten Zeitauflösung lassen sich jedoch keine weitergehenden Aussagen ableiten.

Anregung bei 258 nm mit 420 nJ Um einen möglichen Einfluss der Wellenlänge auf die ablaufende Photoreaktion zu untersuchen, wurden transiente Spektren von *meta*-NPA nach Anregung bei 258 nm aufgenommen. Das bei dieser Wellenlänge erzeugte Signal der Ladungsträger im CaF₂ ist größer als bei Anregung mit 290 nm und die zugehörige, größere Rauschamplitude bleibt nach Korrektur der Messdaten erhalten. Diese Messreihen wurden deshalb mit einer verringerten Pulsenergie von 420 nJ aufgenommen, was wieder ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis der korrigierten Daten ergibt.

Abbildung 4.11 zeigt die transienten Differenzspektren als 2d-Grafiken sowie die Transienten ausgewählter Wellenzahlen. Ein wesentlicher Unterschied ist das stärkere Bleichsignal des Wassers, das sich hier über den gesamten Spektralbereich erstreckt. Die scheinbare spektrale Verschiebung der CO₂-Absorptionsbande im Vergleich zur vorigen Messung ist ein technisch bedingtes Artefakt. Bei Justagearbeiten am Spektrometer zwischen den einzelnen Messungen wurde der Detektor um etwa 0,3 mm versetzt, was einem spektralen Abstand von einem halben Kanal entspricht. Abgesehen von dem vergleichsweise höheren Rauschen zeigen sich nur geringe Unterschiede zur Anregung bei 290 nm, was die weitere Auswertung bestätigt.

Die globale Analyse wurde mit sowohl mit drei ($\tau_1 = 0,35$ ps, $\tau_2 = 200$ ps, $\tau_3 := \infty$) als auch mit vier ($\tau_1 = 0,14$ ps, $\tau_2 = 3,2$ ps, $\tau_3 = 220$ ps, $\tau_4 := \infty$) Zeitkonstanten durchgeführt, wobei Zeitnullpunkt $t_0(\tilde{\nu})$ und Kreuzkorrelationsbreite $w(\tilde{\nu})$ ebenfalls optimiert wurden. Auch hier ergibt sich mit vier Komponenten eine optimale Beschreibung der Daten wobei die ermittelten Zerfallszeiten sehr gut mit den bisher diskutierten übereinstimmen. Die zerfallassozierten Spektren sowie die Parameter $t_0(\tilde{\nu})$ und $w(\tilde{\nu})$ für vier Zeitkonstanten werden in Abbildung 4.12 dargestellt. Sie ähneln denen nach Anregung bei 290 nm mit 750 nJ, für die Interpretation sei daher auf den entsprechenden Abschnitt (ab S. 88) verwiesen.

Im Detail ergeben sich einige kleine Unterschiede zwischen beiden Messungen: Die kürzeste Zeitkonstante $\tau_1 = 0,14$ ps ist hier signifikant größer, obwohl sich nach der Analyse dieselbe Zeitauflösung und eine geringere Dispersion ergibt (Abb. 4.12(b)). Damit sind verlängerte Pulsdauern der Anregung als Ursache auszuschließen. Mit der kürzeren Wellenlänge ist die Population höherer elektronisch angeregter Zustände zu erwarten. Die damit verbundenen, veränderten Relaxationsprozesse stellen eine wahrscheinliche Erklärung für die Verlangsamung der initialen Kinetik dar.

Das zerfallassozierte Spektrum zu τ_2 ähnelt dem der Messung mit Anregung bei 290 nm, wobei die negative Amplitude im Bereich der CO₂-Absorption geringer ausfällt. Die Komponente τ_3 trägt nur noch unwesentlich zur Bleichbande bei $\tilde{\nu} < 2325$ cm⁻¹ bei. Die fehlende Kompensation durch dieses breite positive Signal, das der Bildung der Bleichbande entspricht, erklärt auch die negative Amplitude dieses Spektrums für $\tilde{\nu} > 2360$ cm⁻¹.

Trotz der diskutierten Unterschiede ergeben sich in der Zuordnung der Komponenten, die in der globalen Analyse erhalten wurden, keine Abweichungen zu der Messung mit Anregung bei 290 nm. Da auch die Zeitkonstanten identisch sind kann davon ausgegangen werden, dass der Mechanismus der beobachteten Photodecarboxylierungsreaktion weitgehend unabhängig von der Anregungswellenlänge ist.

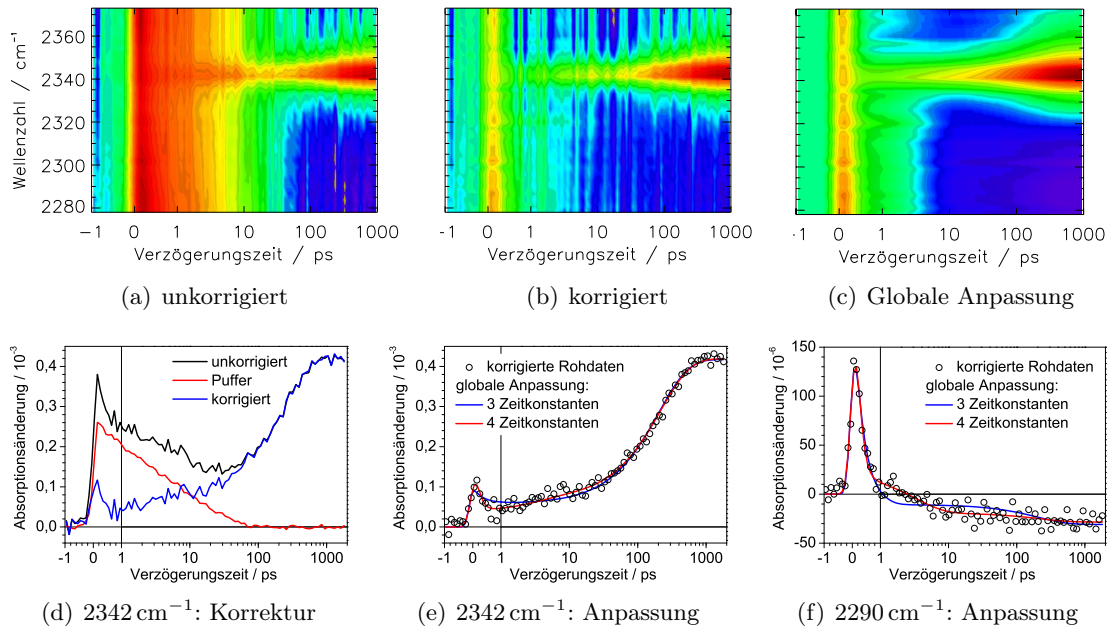


Abbildung 4.11: Globale Analyse der transienten Spektren von m-NPA nach Anregung bei 258 nm mit 420 nJ. Die 2d-Grafiken zeigen die unkorrigierten und korrigierten transienten Differenzspektren sowie das Ergebnis der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten. Die durchgeführte Korrektur durch Subtraktion des skalierten Puffersignals ist für die Wellenzahl der CO₂-Bande (2342 cm⁻¹) in (d) dargestellt. In (e) und (f) werden die korrigierten Daten mit den globalen Anpassungsfunktionen mit drei und vier Zeitkonstanten im Bereich der CO₂-Absorption und der Bleichbande des Wassers verglichen.

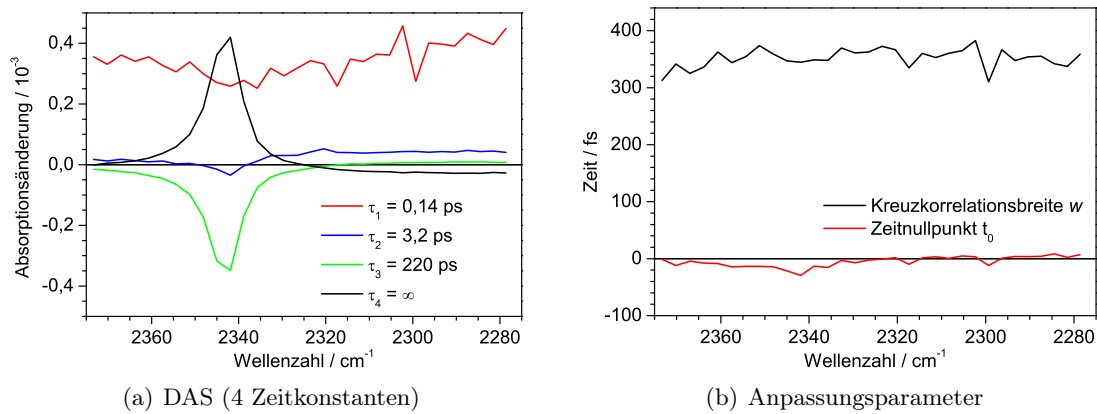


Abbildung 4.12: Zerfallasoziierte Spektren von meta-NPA nach Anregung bei 258 nm mit 420 nJ für die optimale Anpassung mit vier Zeitkonstanten (a). In (b) sind die optimierten Anpassungsparameter für Zeitnullpunkt und Kreuzkorrelationsbreite dargestellt, die ebenfalls im Rahmen der globalen Analyse bestimmt wurden.

ortho-NPA

Anregung bei 258 nm mit 450 nJ Wegen der höheren Absorption bei 258 nm wurde *ortho*-NPA ausschließlich bei dieser Wellenlänge angeregt, die Energie der Anregungspulse betrug 450 nJ. Abbildung 4.13 zeigt die gemessenen transienten Absorptionsänderungen als 2d-Grafiken sowie die Signalverläufe bei ausgesuchten Wellenzahlen. Die Quantenausbeute der Photodecarboxylierung ist für die *ortho*-Konstitution etwa fünfzehnmal geringer als für *meta*, was sich in dem nur gering ausgeprägten CO₂-Signal widerspiegelt. Das breitbandige Bleichsignal des Wassers erstreckt sich, wie bei der Messung des *m*-NPA mit Anregung bei 258 nm, über den gesamten Spektralbereich.

Die Transienten zeigen nahezu keine Zeitabhängigkeit im Bereich der Absorptionsbande des entstehenden CO₂, welches hier bereits größtenteils innerhalb von einigen 100 fs gebildet wird. Diese stationäre Absorption resultiert aus der Überlagerung mit dem breitbandigen Bleichsignal: Folgen beide Signale derselben Dynamik und besitzen ähnliche Amplituden, dann kompensieren sich die zeitabhängigen Absorptionsänderungen. Die Transienten aus dem Bereich der Bleichbande zeigen eine dem *m*-NPA vergleichbare zeitliche Entwicklung.

Die globale Analyse wurde wieder für die Anpassung mit drei ($\tau_1 = 0,16$ ps, $\tau_2 = 9,0$ ps, $\tau_3 := \infty$) und vier ($\tau_1 = 0,14$ ps, $\tau_2 = 4,5$ ps, $\tau_3 = 200$ ps, $\tau_4 := \infty$) Zeitkonstanten durchgeführt. Die Unterschiede zwischen diesen angepassten Funktionen sind nur gering und die Anpassung mit drei Exponentialfunktionen ergibt innerhalb des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bereits eine ausreichend gute Beschreibung der Daten. Wegen der guten Übereinstimmung der bei vier Komponenten erhaltenen Zeitkonstanten mit denen der Messung von *m*-NPA mit Anregung bei 258 nm wird diese Zerfallsfunktion als optimal angesehen. Trotzdem enthält Abbildung 4.14 zum Vergleich die zerfallassozierten Spektren beider Varianten.

Wegen der niedrigen Quantenausbeute der Decarboxylierung zeigt sich im Spektrum zu $\tau_4 = \infty$ bei *o*-NPA nur eine geringe Absorption durch CO₂ – die Amplitude ist vergleichbar mit dem entstandenen Bleichsignal des Wassers. Es ergeben sich ebenfalls kleinere Beiträge der Bildung von CO₂ in den zerfallassozierten Spektren zu τ_2 und τ_3 und dementsprechend eine positive Amplitude von τ_3 im Spektralbereich $\tilde{\nu} > 2350$ cm⁻¹.

Weitere relevante Unterschiede zu dem bereits diskutierten Datensatz (*m*-NPA, 290 nm, 420 nJ) sind nicht zu verzeichnen, daher ist die weitere Interpretation der globalen Analyse analog und wird hier nicht wiederholt. Die Auswertung deutet darauf hin, dass die Energieumverteilung an das Wasser auf derselben Zeitskala wie bei *m*-NPA abläuft ($\tau_2 \approx 4$ ps und $\tau_3 \approx 200$ ps), die Relaxationsprozesse besitzen also dieselben Raten. Obwohl die Zeitkonstante τ_3 auch bei *o*-NPA gefunden wurde, trägt diese hier nur unwesentlich zur Freisetzung von CO₂ bei.

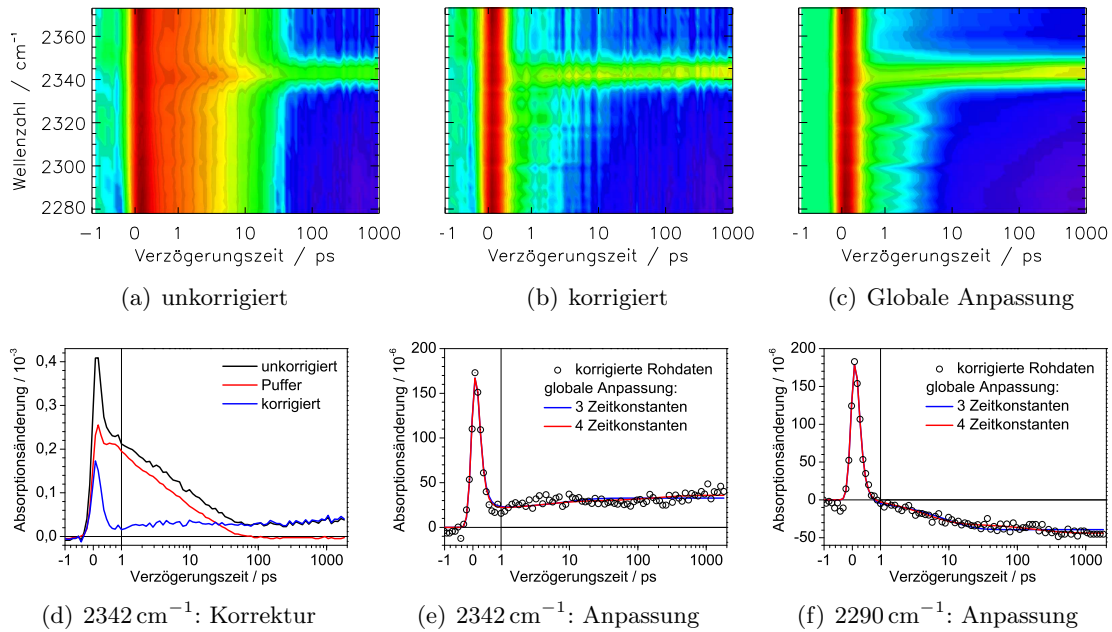


Abbildung 4.13: Globale Analyse der transienten Spektren von *ortho*-NPA nach Anregung bei 258 nm mit 450 nJ. Die 2d-Grafiken zeigen die unkorrigierten und korrigierten transienten Differenzspektren sowie das Ergebnis der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten. Die durchgeführte Korrektur durch Subtraktion des skalierten Puffersignals ist für die Wellenzahl der CO₂-Bande (2342 cm⁻¹) in (d) dargestellt. In (e) und (f) werden die korrigierten Daten mit den globalen Anpassungsfunktionen mit drei und vier Zeitkonstanten im Bereich der CO₂-Absorption und der Bleichbande des Wassers verglichen.

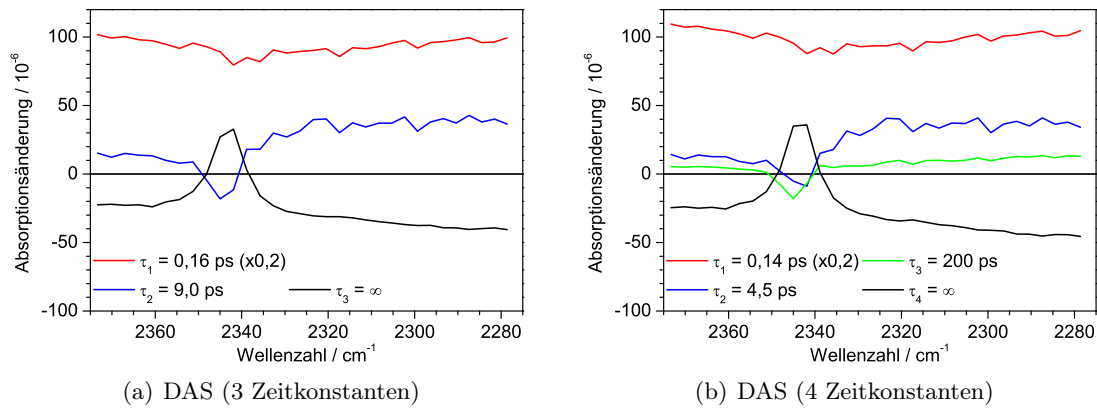


Abbildung 4.14: Zerfallassozierte Spektren von *ortho*-NPA nach Anregung bei 258 nm mit 450 nJ für die Anpassung mit drei und vier Zeitkonstanten. Das Spektrum der Komponente τ_1 besitzt eine sehr große Amplitude und wurde für diese Abbildung mit einem Faktor von 0,2 multipliziert. Auf die Darstellung der ebenfalls angepassten Zeitnullpunkte und Kreuzkorrelationsbreiten wird verzichtet.

para-NPA

Anregung bei 290 nm mit 750 nJ Das *para*-Isomer wurde mit SFG bei einer Wellenlänge von 290 nm mit einer Pulsenergie von 750 nJ nahe des Absorptionsmaximums (285 nm) angeregt. Abbildung 4.15 zeigt die 2d-Grafiken der transienten Absorptionsänderungen und Transienten ausgesuchter Wellenzahlen. Während bei *m*-NPA und *o*-NPA bereits innerhalb der Zeitauflösung des Experimentes ein signifikanter Anteil von CO₂ freigesetzt wird, ist dies in den 2d-Grafiken von *para*-NPA nicht zu erkennen. Die Transiente bei 2345 cm⁻¹ bestätigt diesen Unterschied: Unmittelbar nach dem Abklingen des kurzlebigen breitbandigen Signals ist kein positives Signal zu erkennen und der Anstieg innerhalb der ersten Pikosekunden ist nur sehr gering. Bei längeren Verzögerungszeiten steigt die Absorption des CO₂ stark an und übertrifft wegen der effizienten Anregung nahe des Absorptionsmaximums sogar den bei *m*-NPA erreichten Wert.

Die globale Analyse wurde wieder für die Anpassung mit drei ($\tau_1 = 0,07$ ps, $\tau_2 = 220$ ps, $\tau_3 := \infty$) und vier ($\tau_1 = 0,06$ ps, $\tau_2 = 30$ ps, $\tau_3 = 200$ ps, $\tau_4 := \infty$) Zeitkonstanten durchgeführt. Die angepassten Zerfallsfunktionen sind in den Transienten eingezeichnet und die zerfallassozierten Spektren werden in 4.16 dargestellt. Mit drei Zeitkonstanten wird bereits eine gute Modellierung der Daten erreicht, im Bereich der CO₂-Bande sind kaum Unterschiede zwischen beiden Varianten erkennbar. Sowohl die Anpassung von drei als auch von vier Komponenten ergibt eine Zeitkonstante von 200 ps, die als einzige der Photodecarboxylierung zugeordnet werden kann. Um die Datensätze zu vergleichen wird im Folgenden die Anpassung mit vier Zeitkonstanten diskutiert.

Bis auf die Komponente τ_2 stimmen die in der globalen Analyse ermittelten Werte und zerfallassozierten Spektren sehr gut mit denen von *m*-NPA überein. Der Wert von $\tau_2 = 30$ ps liegt um eine Größenordnung über denen von $\tau_2 \approx 4$ ps für *ortho*- und *meta*-NPA. Diese Diskrepanz blieb auch bei Variation der Startwerte der globalen Anpassung stets erhalten, so dass eine Ungenauigkeit der Auswerteprozedur als Ursache auszuschließen ist. Außerdem weist das zugehörige Spektrum keine negative Signatur im Bereich von 2345 cm⁻¹ auf, die der Bildung von CO₂ zugeordnet werden könnte. Folglich ist der Reaktionspfad, der bei den übrigen Konstitutionen zu einer extrem schnellen Freisetzung der Abgangsguppe innerhalb von Pikosekunden führt, hier nicht vorhanden.

Auch im Bereich des Bleichsignals des Wassers kann keine Zeitkonstante von ≈ 4 ps identifiziert werden, was auf einen langsameren Energietransfer an das Lösungsmittel als bei *ortho*- und *meta*-NPA hindeutet.

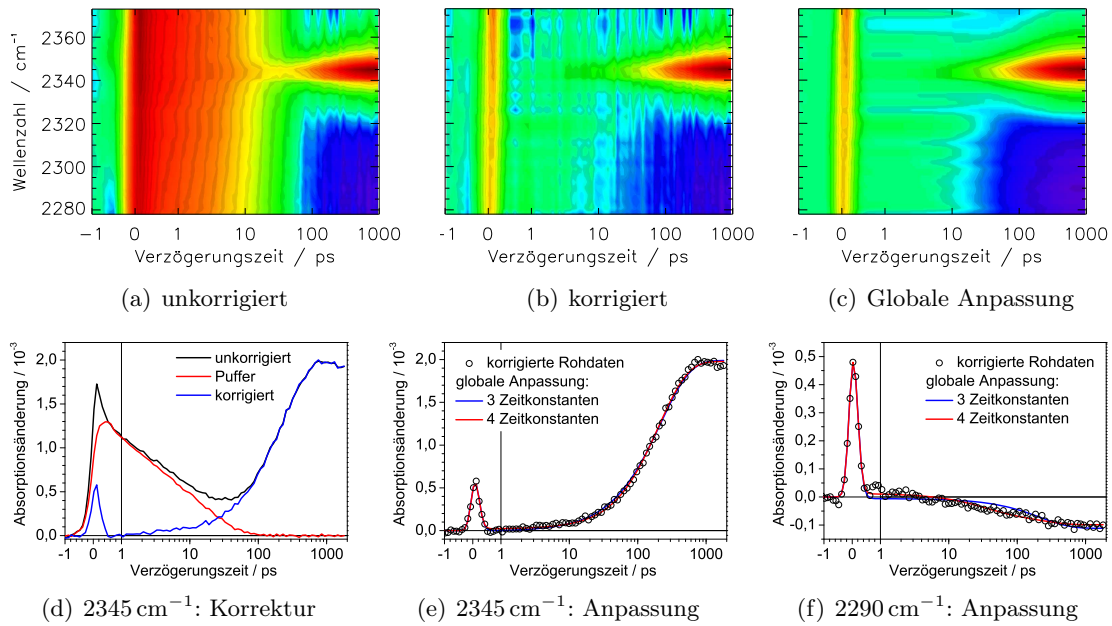


Abbildung 4.15: Globale Analyse der transienten Spektren von p-NPA nach Anregung bei 290 nm mit 750 nJ. Die 2d-Grafiken zeigen die unkorrigierten und korrigierten transienten Differenzspektren sowie das Ergebnis der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten. Die durchgeführte Korrektur durch Subtraktion des skalierten Puffersignals ist für die Wellenzahl der CO₂-Bande (2345 cm⁻¹) in (d) dargestellt. In (e) und (f) werden die korrigierten Daten mit den globalen Anpassungsfunktionen mit drei und vier Zeitkonstanten im Bereich der CO₂-Absorption und der Bleichbande des Wassers verglichen.

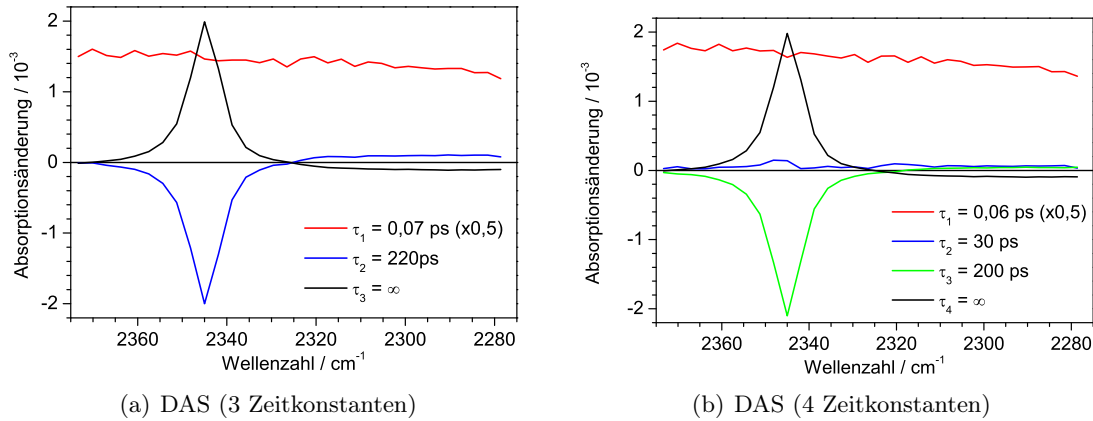


Abbildung 4.16: Zerfallassozierte Spektren von para-NPA nach Anregung bei 290 nm mit 750 nJ für die Anpassung mit drei und vier Zeitkonstanten. Das Spektrum der Komponente τ_1 besitzt eine sehr große Amplitude und wurde für diese Abbildung mit einem Faktor von 0,5 multipliziert. Auf die Darstellung der ebenfalls angepassten Zeitnullpunkte und Kreuzkorrelationsbreiten wird verzichtet.

Isomer	Anregung		Zeitkonstanten			
	λ/nm	E/nJ	τ_1/ps	τ_2/ps	τ_3/ps	τ_4
<i>ortho</i>	258	450	0,14	4,5	200	∞
<i>meta</i>	258	420	0,14	3,2	220	∞
<i>meta</i>	290	750	0,04	3,7	220	∞
<i>para</i>	290	750	0,06	30	200	∞

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Zeitkonstanten nach der Anpassung von vier Komponenten in der globalen Analysen für die Konstitutionsisomere von NPA. Die Zeitkonstante τ_4 wurde auf den Wert ∞ festgesetzt, Zeitnullpunkt und Kreuzkorrelationsbreite wurden ebenfalls für jeden Kanal angepasst. Die ermittelte Kreuzkorrelationsbreite beträgt in allen Messungen etwa 0,35 ps.

4.4 Diskussion

Die durchgeführten Experimente zur Photolyse von NPA erlauben erstmals den Reaktionsverlauf anhand der Freisetzung eines primären Reaktionsprodukts – des Kohlenstoffdioxids – direkt und mit höchster Zeitaufösung zu verfolgen. Die spektral isolierte Absorptionsbande des CO₂ bei 2345 cm⁻¹ interferiert nicht mit den Spektren der übrigen Spezies und stellt somit eine ideale Markerbande zur systematischen Untersuchung der komplexen Photochemie dar.

In den transienten IR-Spektren treten neben den reaktionsbedingten Absorptionsänderungen verschiedene weitere Signale auf: Eine breitbandige positive Absorption dominiert die erhaltenen Spektren bis etwa 100 ps, sie kann induzierten Ladungsträgern in den CaF₂-Fenstern der Küvette zugeordnet werden. Durch Subtraktion des skalierten Datensatzes einer unter identischen Bedingungen durchgeführten Messung des reinen Puffers kann dieser Beitrag herausgerechnet werden.

Die korrigierten transienten Differenzspektren zeigen charakteristische Merkmale in drei verschiedenen Regionen: 1. Eine breitbandige positive Absorptionsänderung entsteht unmittelbar mit der Anregung und zerfällt innerhalb der Kreuzkorrelationsbreite. Der zugrundeliegende Prozess dieses Signals wird tendenziell der Absorption aus dem sehr schnell entvölkerten S_n^* -Zustand zugeordnet. 2. Eine positive Absorptionszunahme in Form eines Lorentz-Profiles mit einem Maximum bei 2345 cm⁻¹ und einer Halbwertsbreite von 9 cm⁻¹ kann der Absorption des freigesetzten, in Wasser gelösten CO₂ zugeordnet werden. 3. Eine breitbandige negative Absorptionsänderung ist stets im Bereich $\tilde{\nu} < 2320 \text{ cm}^{-1}$ und teilweise auch bei $\tilde{\nu} > 2360 \text{ cm}^{-1}$ zu beobachten. Das Signal entspricht dem Ausbleichen einer Kombinationsschwingungsbande des Wassers infolge der lichtinduzierten Temperaturerhöhung während bzw. nach der Reaktion.

Die globale Analyse der korrigierten Daten ergibt, dass alle Messergebnisse durch die Anpassung einer multiexponentiellen Zerfallsfunktion mit vier Zeitkonstanten modelliert werden können, von denen eine festgelegt wird: $\tau_4 := \infty$. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst und die zugehörigen Prozesse werden im Folgenden diskutiert.

In allen Messungen wird innerhalb von 1 ns nach Photoanregung ein stationärer Zustand erreicht bei dem die gemessenen Absorptionsänderungen bis zur maximalen Verzögerungszeit von 1,8 ns konstant bleiben. Dieses Photolyse-Differenzspektrum wird durch die Komponente $\tau_4 := \infty$ modelliert. Es setzt sich aus einem positiven Beitrag durch die Absorption des freigesetzten CO_2 und einem negativen Beitrag durch das Ausbleichen der Absorptionsbande des Wassers zusammen. Daraus wird geschlossen, dass die lichtinduzierte Abspaltung des Kohlenstoffdioxids unabhängig von der Konstitution bereits nach 1 ns vollständig abgeschlossen ist. Entsprechend der Quantenausbeute der Photodecarboxylierung von $\Phi \approx 0,6$ bei *meta*- und *para*-NPA dominiert hier die CO_2 -Absorption, während sie bei *ortho*-NPA ($\Phi = 0,04$) wesentlich geringer ist. Die Anregung von *meta*-NPA bei 258 nm und 290 nm ergab keine Abhängigkeit des Produktspektrums von der Anregungswellenlänge.

Die globale Analyse offenbart weitere Details über die Photodynamik der Isomere: Die Photodecarboxylierung von *m*-NPA wird durch τ_2 und τ_3 modelliert, wobei der mit $\tau_3 = 220$ ps verknüpfte Prozess den Hauptreaktionspfad darstellt: etwa 3/4 des freigesetzten CO_2 entsteht mit dieser Zeitkonstante. Es ist anzunehmen, dass die Decarboxylierung hauptsächlich über den Triplettzustand abläuft [186, 194]. Folglich wird der Prozess mit $\tau_3 \approx 200$ ps der Freisetzung von CO_2 aus dem Triplettzustand zugeordnet. Die Lebensdauer des T_1 -Zustand von Nitrobenzol wird mit 0,5 ns angegeben [174, 175], was im Bereich der hier ermittelten Zeitkonstante liegt und diese These weiter unterstützt.

Die Zeitkonstante $\tau_2 \approx 4$ ps entspricht den Lebensdauern des S_1 -Zustands anderer nitroaromatischer Verbindungen: Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an polycyclischen Nitroaromaten zeigten biexponentielle Abklingfunktionen, deren längere Zeitkonstante von einigen Pikosekunden mit der Depopulation des S_1 assoziiert wurde [177]. Ebenso wurde für Nitrobenzol mit transientser Absorptionsspektroskopie im UV/vis-Spektralbereich eine Zeitkonstante von 5 ps und mit der *transient grating* Methode eine Zeitkonstante von 6 ps gefunden, die mit der Deaktivierung des S_1 durch ISC ($S_1 \rightarrow T_2$) erklärt wurden [175, 176]. Es kann also angenommen werden, dass die Komponente τ_2 die Freisetzung von CO_2 aus dem S_1 -Zustand beschreibt.

Die kurzlebige, spektral unstrukturierte Komponente τ_1 entspricht der internen Konversion innerhalb des angeregten Singulettsystems ($S_n^* \rightarrow S_1$) bzw. der Schwingungsenergieumverteilung und Geometrieänderung innerhalb des ursprünglich angeregten S_1^* -Zustands. Vergleichbare Werte von 100 fs wurden in den Fluoreszenzmessungen an Nitroaromaten sowie in den *transient grating* Messungen an Nitrobenzol entdeckt und der Schwingungsenergielaxation im S_1 zugeordnet ($S_1^* \rightarrow S_1$) [174, 175, 177]. Die Abhängigkeit der ermittelten Zerfallszeiten von den Anregungswellenlängen ist ein Hinweis auf unterschiedliche Relaxationspfade bzw. die nach Anregung bei 258 nm höhere Überschussenergie.

Die bei *meta*-NPA beobachtete Freisetzung von CO_2 innerhalb der Zeitauflösung des Experiments deutet auf die Existenz eines direkten Zerfallskanals hin. Es könnte sich um einen dissoziativen Zustand handeln, der entweder partiell direkt angeregt wird oder der den angeregten Zustand kreuzt und deshalb bei der Relaxation innerhalb des Singulettsystems teilweise populiert wird. Erste quantenchemische Rechnungen in der

Arbeitsgruppe von Prof. Dreuw legen ein solches Szenario nahe [195]: Es wurde zum einen festgestellt, dass der $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang nur eine sehr geringe Oszillatorstärke besitzt und die Anregung daher in höhere Zustände S_n erfolgt. Zum anderen wurde eine Vielzahl konischer Durchschneidungen mit kreuzenden Zuständen gefunden, die eine sehr schnelle interne Konversion in den S_1 vermuten lassen. Von dort aus kommt es über ISC zu einer schnellen Population des T_2 -Zustands. Schließlich wurden Zustandsflächen mit repulsiven Potential entlang der C–C-Bindung identifiziert, die eine direkte Dissoziation auch aus dem angeregten Zustand heraus erlauben.

In dieser Interpretation lassen sich auch die Lösungsmittelsignale einordnen: Der Übergang in den Grundzustand durch interne Konversion aus dem S_1 oder durch ISC aus dem T_1 ist stets mit einer Energieübertragung an das Lösungsmittel verbunden. Deshalb sind die Zeitkonstanten für den Zerfall dieser Zustände auch im Bereich des breiten Bleichsignals der Absorptionsbande des Wassers zu finden – unabhängig von den genauen Reaktionspfaden und ihrer jeweiligen Decarboxylierungsquantenausbeute.

Interessanterweise zeigen die Spektren keine Hinweise auf Kühlprozesse des abgespaltenen CO₂, wie sie z. B. nach der Photolyse organischer Peroxide in Dichlormethan, Tetrachlorkohlenstoff oder Xenon beobachtet wurden [196]. Möglicherweise ist die Schwingungsenergieumverteilung im polaren Lösungsmittel Wasser wesentlich effizienter, so dass die Verbreiterung der Banden zeitlich nicht aufgelöst wird. Oder negative Signale im Spektralbereich $\tilde{\nu} > 2360 \text{ cm}^{-1}$ überlagern die Produktbanden der hoch-schwingungsangeregten Moleküle in den ersten Pikosekunden.

Insgesamt lässt sich für *meta*-NPA folgendes Reaktionsmodell aufstellen: Unmittelbar nach der Anregung in den S_n folgt eine sehr schnelle interne Konversion in den S_1 , wobei durch einen kreuzenden reaktiven Zustand bereits innerhalb der Zeitauflösung des Experiments ein kleiner Teil von etwa 10% des CO₂ freigesetzt wird. Der S_1 wird durch zwei unterschiedliche Reaktionen entvölkert: ein großer Teil geht durch Interkombination in den Triplettzustand über, der Rest über interne Konversion in den Grundzustand. In den transienten Spektren zeigt die Komponente $\tau_1 \approx 3,5 \text{ ps}$ den S_1 -Zerfall, da dieser mit einer weiteren Freisetzung von CO₂ und der Aufheizung des Wassers verbunden ist. Aus den vorliegenden Daten kann nicht entschieden werden, ob die Abspaltung von CO₂ im angeregten Zustand stattfindet, über einen kreuzenden Zustand abläuft oder erst nach der Konversion in den Grundzustand erfolgt. Es kann auch keine Aussage gemacht werden, ob die ISC direkt in den T_1 führt oder ob zunächst ein höher angeregten Triplettzustand wie der T_2 populierte wird, der durch interne Konversion schnell relaxiert – wie aus den theoretischen Arbeiten geschlossen wird [195]. Der Hauptdeaktivierungskanal des Triplettzustands ist die Decarboxylierung mit $\tau_3 = 220 \text{ ps}$, wobei etwa 75 % der gesamten CO₂-Absorption bei langen Verzögerungszeiten auf diesen Reaktionpfad zurückzuführen sind.

Für *ortho*-NPA werden im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnis dieselben Zeitkonstanten wie für *m*-NPA ermittelt, daher ist die Interpretation hier analog. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Konstitutionen liegt im zerfallassozierten Spektrum zu τ_3 : Bei *o*-NPA weist es nur einen unwesentlichen negativen Beitrag im Bereich der CO₂-Bande auf, entsprechend der geringen Quantenausbeute der Decarboxylierung. Die

zerfallassozierten Spektren zu τ_2 und τ_3 zeigen, dass beide Zeitkonstanten im Bereich der ausgebleichten Lösungsmittelbanden nachweisbar sind. Es kann also auch bei *ortho*-NPA von einer Besetzung des Triplettzustands ausgegangen werden, der mit einer Zeitkonstanten von $\tau_3 = 200$ ps zerfällt. Obwohl sich dieselben Reaktionsraten für die Freisetzung von CO_2 ergeben, wird offensichtlich der Hauptreaktionskanal der Decarboxylierung bei *o*-NPA effektiv gequenchet. Die molekulare Struktur legt einen ultraschnellen intramolekularen Protonentransfer auf die Nitrogruppe nahe, wie er als Reaktionsmechanismus für *caged compounds* auf Basis von *ortho*-Nitrobenzylverbindungen oder auch die Phototautomerie von *ortho*-Nitrotoluol etabliert ist [179, 182, 197]. Die globale Analyse liefert für *m*-NPA und *o*-NPA nahezu identische Zeitkonstanten, was auf vergleichbare Lebensdauern der beteiligten Zustände schließen lässt. Das ist überraschend angesichts der stark variierten Reaktionsmechanismen der beiden Konstitutionen. Gleichwohl ließe sich dieser Befund mit der Annahme erklären, dass sowohl die Decarboxylierung als auch der Protonentransfer erst mit der Interkombination $T_1 \rightarrow S_0$ in den Grundzustand erfolgen. In Anbetracht der kleinen Amplituden und der notwendigen Korrektur durch Subtraktion des CaF_2 -Signals kann eine solche These hier jedoch nicht verifiziert werden.

Bei *para*-NPA erfolgt die Abspaltung des CO_2 allein durch den Prozess zu $\tau_3 = 200$ ps, ein entsprechender Beitrag der übrigen Zeitkonstanten kann ebenso ausgeschlossen werden wie die direkte Dissoziation innerhalb der Kreuzkorrelationszeit. Außerdem ist die Zeitkonstante $\tau_2 = 30$ ps bei *p*-NPA um eine Größenordnung länger als bei den übrigen Isomeren ($\tau_2 \approx 4$ ps) und ihr zerfallassoziertes Spektrum zeigt keine Anhaltspunkte für die Abspaltung von CO_2 . Die bei *meta*- und *ortho*-NPA unmittelbar nach der Photoanregung auftretende signifikante Absorptionzunahme durch das Kohlenstoffdioxid ist hier nicht zu beobachten. *para*-NPA besitzt zwar dieselbe Photodecarboxylierungsquantenausbeute wie *meta*, aber die Reaktion verläuft monoexponentiell: Es existieren folglich keine Reaktionspfade die zu einer schnellen Dissoziation innerhalb von Pikosekunden führen. Die quantenchemischen Rechnungen weisen auf die direkte Anregung des S_1 -Zustands von *para*-NPA hin, damit wären die interne Konversion $S_n \rightarrow S_1$ und damit verbundene Übergänge in kreuzende dissoziative Zustände auszuschließen und es gibt einen quantitativen Populationstransfer in das Triplettssystem. Der T_1 -Zustand zerfällt dann mit derselben Zeitkonstante und Quantenausbeute wie bei *meta*-NPA.

Gegenüber Messungen im sichtbaren Spektralbereich ist die eindeutige Zuordnung der Signale zum Reaktionsprodukt CO_2 im MIR möglich, so dass die Zeitkonstanten der Decarboxylierung und die relative Ausbeute der verschiedenen Reaktionskanäle direkt bestimmt und miteinander verglichen werden können. Die erhaltenen Daten lassen sich mit dem etablierten Reaktionsmodell verstehen: Es ist bekannt, dass der Triplettzustand bei Nitrogruppen in *meta*- oder *para*-Position einen starken elektronenziehenden Einfluss hat und so die photochemischen Eigenschaften bestimmt [179, 194], während im *ortho*-Isomer weitere Deaktivierungskanäle zur Verfügung stehen [197]. Aufgrund der sehr ähnlichen Kinetik von *meta*- und *para*-NPA kann ein Einfluss der Resonanzstabilisierung durch das *aci*-Nitrobenzylanion auf die Decarboxylierungsreaktion ausgeschlossen werden.

Die Frage nach einer geeigneten Substanz zur Photoaktivierung von CO_2 kann nun beantwortet werden. In allen Isomeren ist die Freisetzung des CO_2 innerhalb einer

Nanosekunde abgeschlossen. Allerdings kann *ortho*-NPA wegen der zu geringen Quantenausbeute und *para*-NPA wegen der langsam ablaufenden Folgereaktionen, wie der Umwandlung der Nitrobenzylanionen zum stabilen 4,4'-Dinitrobenzyl, nicht verwendet werden. Die Reprotonierung des *meta*-Nitrobenzylanions zum stabilen Nitrotoluol sollte auch in schwach basischer wässriger Lösung relativ schnell erfolgen, solange der pH-Wert unterhalb des pK_S-Wertes von *meta*-Nitrotoluol liegt. Für die geplanten Anwendungen ist daher nicht mit störenden langlebigen Intermediaten zu rechnen. Somit bleibt *meta*-NPA als idealer Kandidat. Und der Beweis der Anwendbarkeit wurde inzwischen ebenfalls erbracht: Im Rahmen der Doktorarbeit von Gabriela Schäfer [187] wurde erfolgreich die Aktivierung des Enzyms RuBisCO² nach Freisetzung von CO₂ aus m-NPA zeitaufgelöst beobachtet. Somit wurde gezeigt, dass m-NPA zur schnellen Aktivierung von Kohlenstoffdioxid durch Photodecarboxylierung geeignet ist und als neuartiger *caged compound* eingesetzt werden kann.

4.5 Ausblick

Mit den erfolgreich durchgeführten Messungen wurde der Weg für die systematische Untersuchung der Photodynamik dieser wichtigen Verbindungsklasse aufgezeigt. Unterschiede in Zeitkonstanten und Ausbeuten der Freisetzung des CO₂ wurden erstmals direkt und mit höchster Zeitauflösung untersucht.

Ein wesentlicher Unsicherheitsfaktor bei der Auswertung und Interpretation der erhaltenen Spektren stellt die Absorption des Abtastlichtes durch die in den Küvettenfenstern nach Zweiphotonenabsorption induzierten Ladungsträger dar. Bei Verwendung eines freien Flüssigkeitsstrahls kann auf die Küvettenfenster verzichtet werden, was diesen Effekt vollkommen eliminiert. Um einen derartigen Probenstrahl mit der notwendigen geringen Schichtdicke und hohen Stabilität zu erzeugen gibt es zwei erprobte Verfahren: 1. Die Probenlösung wird unter Druck durch eine entsprechend geformte Düse gepresst. Diese sogenannten *Jets* sind kommerziell erhältlich und werden z. B. in Farbstofflasern eingesetzt. 2. Die Flüssigkeit läuft aus einem Reservoir aufgrund der Schwerkraft nach unten und wird dabei von zwei dünnen Drähten geführt. Durch die Oberflächenspannung entsteht zwischen den Drähten ein dünner und sehr stabiler Probenfilm [198]. Auf diese Weise würde auch die Subtraktion des skalierten Hintergrundsignals entfallen, was die Qualität der Daten deutlich verbessert, da die Korrektur in Anbetracht der zum Teil sehr kleinen Signale nicht unproblematisch ist: 1. Das Rauschen der Hintergrundmessung verschlechtert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. 2. Aufgrund von Langzeitschwankungen im Anreg- oder Abtastzweig ist die Messung unter identischen Bedingungen für das Hintergrundspektrum schwierig und muss ggf. wiederholt werden. 3. Insgesamt sollte sich die erforderliche Messzeit bei gleichem Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich verkürzen. Das gestattet wiederum alle Isomere unter denselben Bedingungen zu messen und die Ergebnisse direkt zu vergleichen, da ein Nachjustieren der Anlage in diesen Zeiträumen im Allgemeinen nicht notwendig ist.

²RuBisCO: Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

Neben technischen Verbesserungen und der Erweiterung des untersuchten Spektralbereichs auf die Absorptionsbanden der Reaktionsedukte ergeben sich vor allem bei der Probenpräparation zahlreiche Ansätze für eine systematische Untersuchung der Reaktionsmechanismen: Änderung des pH-Werts und/oder des Lösungsmittels, Messung unter Ausschluss von Sauerstoff oder unter Zugabe chemischer Triplettenquencher oder -sensibilisatoren. Zusammen mit den derzeit durchgeführten Messungen der transienten Absorption im sichtbaren Spektralbereich und den quantenchemischen Rechnungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dreuw sollten sich tiefe Einblicke in die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften dieser Verbindungen gewinnen lassen.

Weitere Möglichkeiten bieten Experimente an vergleichbaren Molekülen: In der Photolyse der häufig eingesetzten α -Carboxy-2-Nitrobenzylschutzfunktionen stellt die Decarboxylierung einen Konkurrenzprozess zur Abspaltung der gewünschten Abgangsgruppe dar [197]. Auch diese Reaktionen können systematisch untersucht werden um Anhaltspunkte für die weitere Entwicklung optimierter *caged compounds* zu erhalten.

5 Proteorhodopsin

Es gibt mehr Leute, die kapitulieren, als solche, die scheitern.

(Henry Ford)

5.1 Einleitung

Vor etwa 10 Jahren wurde mit Proteorhodopsin das erste bakterielle Rhodopsin in unku­ltivierten marinen γ -Proteobakterien gefunden [199, 200]. Vergleichbare Retinalproteine sind auch für Archäen (Bakteriorhodopsin: BR, Halorhodopsin: HR, Sensorrhodopsin I: SRI und Sensorrhodopsin II: SRII) [201–206] und Eukaryoten (Channelrhodopsin-1 und -2 [207, 208]) bekannt. Allen gemeinsam ist die Tertiärstruktur aus sieben Transmembranhelices sowie die kovalente Bindung des Retinalchromophors über eine Schiffbase an ein Lysin. Von PR sind bisher über 4000 Varianten aus unterschiedlichen marinen Lebensräumen entdeckt worden [209–212]. Diese können anhand ihres Absorptionsmaximums im sichtbaren Spektralbereich im Wesentlichen in zwei Klassen eingeteilt werden: die grün (GPR: $\lambda_{\max} \approx 525$ nm) und die blau absorbierenden (BPR: $\lambda_{\max} \approx 490$ nm) Proteorhodopsine [213, 214]. In dieser Arbeit wird ausschließlich die grün absorbierende Form aus dem marinen γ -Proteobakterium SAR 86 untersucht, so wie in den meisten Veröffentlichungen. Diese wird im Folgenden mit PR abgekürzt.

Die Struktur von PR konnte bisher nicht mit atomarer Auflösung aufgeklärt werden, jedoch deuten theoretische Modellierungen darauf hin, dass GPR eine gute Übereinstimmung mit der archealen Protonenpumpe BR besitzt, während sich die blau absorbierende Form besser mit der Struktur von Sensorrhodopsin II beschreiben lässt [217].

Die photochemische bzw. spektroskopische Charakterisierung von Proteorhodopsin ergibt weitere Hinweise auf die Ähnlichkeit von GPR und BR [200, 213–215, 218–220]: Die Absorption eines Photons durch das Retinalchromophor führt zu einer all-*trans* nach 13-*cis*-Isomerisierung des Retinals, dem sogenannten K-Intermediat, dem weitere, thermisch getriebene Reaktionsschritte folgen. Im basischen pH-Bereich wird dabei eine auswärts gerichteter Protonentransport [215, 219, 221] sowie das Auftreten von fünf charakteristischen, spektral unterscheidbaren Reaktionsintermediaten gefunden [200, 222, 223], die analog zu BR mit K, L, M, N und O bezeichnet werden. Diese Abfolge bezeichnet man als Photozyklus, an dessen Ende wieder das regenerierte Protein mit dem all-*trans*-Retinal vorliegt. Der Transportmechanismus ist für BR und HR bereits eingehend untersucht und weitgehend aufgeklärt worden [224–228]. Da PR und BR eine hohe Sequenzhomologie innerhalb der Retinalbindetasche und unter den am Protonentransport beteiligten Aminosäuren aufweisen wird angenommen, dass BR als

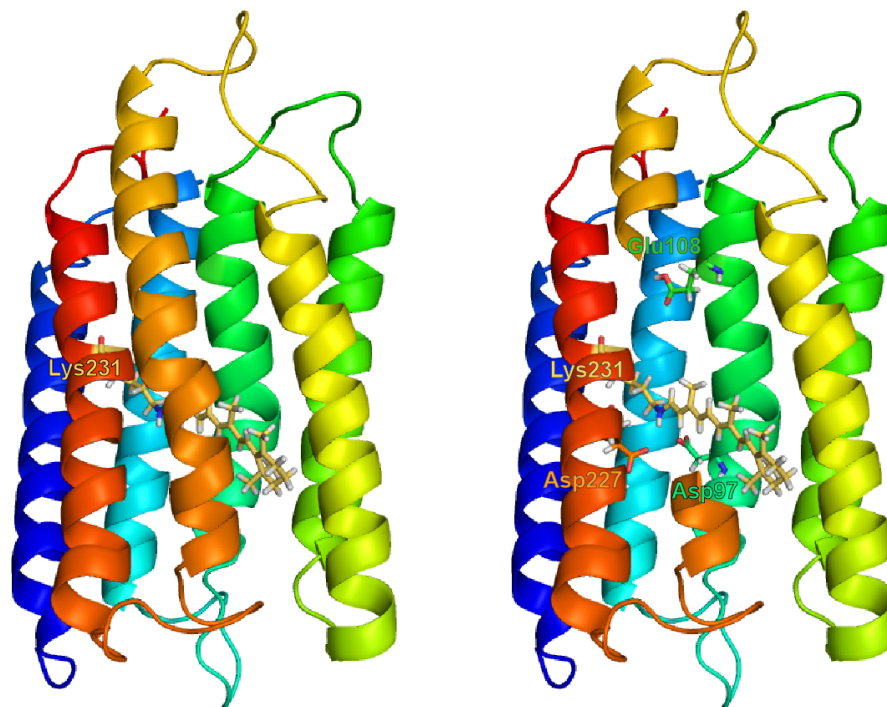


Abbildung 5.1: Die gezeigte Struktur von PR basiert auf einem Homologiemodell bei dem die Aminosäuresequenz an eine gelöste Kristallstruktur von BR angepasst wurde [215]. Links ist die gesamte Sekundärstruktur als Cartoon dargestellt, in die die Aminosäure Lys 231 und das über die Schiffsbasis kovalent daran gebundene Retinal als Stäbchenmodell eingefügt sind. Rechts sind zusätzlich folgende wichtige Residuen gezeigt: Glu108 (primärer Protonendonator), Asp97 (primärer Protonenakzeptor) und Asp227. Die Strukturdaten des BR wurden der Proteindatenbank entnommen [216]: www.pdb.org, PDB ID: 1C3W

Modellsystem für PR im basischen Bereich dienen kann [213, 215, 217, 229, 230]. Die konservierten Residuen sind: die kovalente Bindung des Retinals über eine Schiffsbasis an Lys231 (BR: Lys216), der primäre Protonendonator Glu108 (BR: Asp96), der primäre Protonenakzeptor Asp97 (BR: Asp85) und der Protonenakzeptorkomplex Arg94, Asp227 (BR: Arg82, Asp212). Abbildung 5.1 zeigt eine Struktur des Proteins mit dem Retinal und einigen wichtigen Aminosäuren, die auf einer Modellrechnung auf Basis einer gelösten Kristallstruktur von BR beruht [215, 216].

Ein signifikanter Unterschied zwischen PR und BR ist jedoch der pK_S -Wert des primären Protonenakzeptors. Bei PR liegt dieser im Bereich von $6,9 \leq pK_S(\text{Asp97}) \leq 8,5$ [215, 222, 231, 232] und ist damit deutlich höher als bei BR: $pK_S(\text{Asp85}) \approx 2$ [227, 228]. Als Ursache wird eine stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem in Proteorhodopsin hochkonservierten His75 und Asp97 vermutet, die in BR nicht auftritt [214, 230, 233, 234].

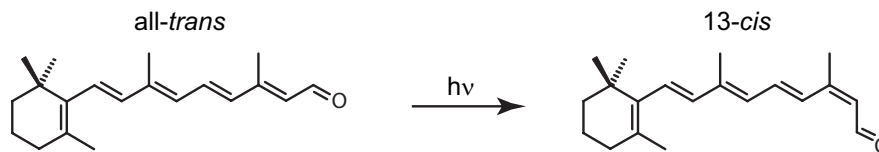


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der lichtinduzierten all-*trans* → 13-*cis*-Isomerisierung des Retinals. Im PR ist das Retinal über eine protonierte Schiff'sche Base kovalent an Lys231 gebunden.

Der ungewöhnlich hohe pK_S -Wert von Asp97 ermöglichte die Untersuchung der Proteinaktivität bei protoniertem primären Protonenakzeptor, was eine Umkehr der Pumprichtung – also einen nach innen gerichteten Protonentransport – ergab [215]. Diese bemerkenswerte variable Vektorialität ist mittlerweile verifiziert worden [221], war aber lange Zeit Gegenstand der Diskussion, da sie mit Photostrommessungen an orientierten Membranen nicht nachgewiesen wurde [219].

Auch im Photozyklus gab es bei $pH < pK_S(\text{Asp97})$ deutliche Abweichungen zu alkalischen Lösungen und somit zu BR. Das charakteristische M-Intermediat des Photozyklus trat in spektroskopischen Untersuchungen des Reaktionsverlaufes bei Raumtemperatur nicht auf [215, 235, 236]. Der M-Zustand stellt einen essentiellen Schritt für das vorgeschlagene Transportmodell dar, den sogenannten *Switch*-Prozess, bei dem sich die Zugänglichkeit des Transportkanals umkehrt [215]. Inzwischen konnte jedoch auch im sauren pH-Bereich bei niedrigen Temperaturen ein vollständiger Photozyklus im sichtbaren Spektralbereich nachgewiesen werden [221]. Dafür wurde ausgenutzt, dass bei niedrigen Temperaturen der Übergang zwischen den Zuständen kinetisch gehemmt ist, so dass das M-Intermediat in der Probenzelle akkumuliert werden konnte. Die Gesamtdauer des Photozyklus wird nicht messbar durch den pH-Wert beeinflusst, sie liegt im Sauren wie im Alkalischen bei unter 50 ms.

Der bidirektionale Protonentransport im Bereich des physiologischen pH-Wertes des Meerwassers erschwert die Klärung der Funktion von Proteorhodopsin. Neben der Funktion als lichtgetriebene Protonenpumpe analog zu BR erscheint auch die Annahme regulatorischer bzw. sensorischer Funktionen gerechtfertigt [214].

Erste spektroskopische Untersuchungen der *trans* → *cis*-Isomerisierung sowohl von rekonstituierten als auch von solubilisierten PR-Proben in H_2O zeigten eine biexponentielle Deaktivierung des angeregten Zustands und eine ausgeprägte Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes vom pH-Wert [237, 238]. Diese Abhängigkeiten sind nicht auf eine Heterogenität der Retinalkonfiguration zurückzuführen: Zwar zeigten Retinalextraktionsstudien an dunkel adaptierten PR einen Anteil von 80 % all-*trans*- und 20 % 13-*cis*-Retinal [215], aber neuere Untersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie und Festkörper-NMR belegen, dass das Retinal im dunkel adaptierten PR praktisch vollständig in all-*trans*-Konfiguration vorliegt [239, 240].

In Übereinstimmung mit den für BR etablierten Reaktionsmodellen [241] wurde ein Reaktionsmodell vorgeschlagen, das diese Beobachtung durch eine Aufspaltung des Reaktionspfades im elektronisch angeregten Zustand erklärt [238]: Nach der Photoanregung

in die Franck-Condon-Region des S_1 -Zustands kommt es zur ultraschnellen Relaxation innerhalb von ca. 150 fs. Diese verläuft zunächst entlang der C=C-Streckschwingung der konjugierten Kohlenstoffkette, gefolgt von einer Torsion um die C_{13} - C_{14} -Bindung. Nun kann ein Teil der Moleküle direkt durch eine konische Durchschneidung in den Grundzustand übergehen, was dem sehr schnellen Deaktivierungspfad mit Zeitkonstanten im Pikosekundenbereich entspricht. Die übrigen Moleküle erreichen ein flaches Minimum auf der S_1 -Zustandsfläche und können den konischen Schnitt nur indirekt über eine Barriere erreichen, was sich in dem zweiten, langsameren Deaktivierungspfad mit Zeitkonstanten von ca. 10 ps widerspiegelt. Die pH-Abhängigkeit der Kinetik wurde durch die elektrostatische Wechselwirkung mit der bei $\text{pH} > \text{pK}_S(\text{Asp97})$ deprotonierten, also negativ geladenen Seitenkette von Asp97 erklärt, die sich in unmittelbarer Nähe des Retinals befindet. Dieser Einfluss auf die S_1 -Zustandsfläche führt zu veränderten Energiebarrieren und damit Verzweigungsverhältnissen zwischen schnellem und langsamem Kanal.

In dieser Arbeit wird die Primärreaktion von solubilisiertem PR sowie der Mutante PR-D97N¹ in D_2O mittels Kurzeitspektroskopie im mittleren infraroten sowie im sichtbaren Spektralbereich untersucht. Durch Variation des pH-Wertes bzw. die Mutation PR-D97N kann die Isomerisierung unter verschiedenen elektrostatischen und sterischen Bedingungen der Retinalumgebung verfolgt werden. Bei PR-D97N ist der primäre Protonenakzeptor Aspartat durch ein Asparagin ersetzt, so dass statt der Säurefunktion der Seitenkette ein Säureamid vorliegt (vgl. Abb. 5.13, S. 128). Insbesondere sollten diese Variationen auch das innerhalb des Proteins vorhandene Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Die hohe Struktursensitivität im MIR soll dann die Frage nach den unmittelbar nach Anregung ablaufenden Konfigurationsänderungen des Retinals beantworten und so weitere Einblicke in die pH-Abhängigkeit der Isomerisierungsreaktion erlauben. Die gleichzeitige Untersuchung der Probe im Sichtbaren in derselben D_2O -Pufferlösung ermöglicht den direkten Vergleich der in beiden Spektralbereichen erhaltenen kinetischen Daten, also die Zuordnung der Infrarotsignale zum elektronisch angeregten oder Grundzustand. Darüberhinaus lassen sich aus dem Vergleich der Kurzzeitmessungen im sichtbaren Spektralbereich für die Lösungsmittel H_2O und D_2O weitere Aussagen ableiten – beispielsweise über den kinetischen Isotopeneffekt der Primärreaktion. Insgesamt ergeben sich neue Erkenntnisse über die elektrostatische sowie sterische Kontrolle des Isomerisierungsmechanismus durch die Umgebung des Retinals.

5.2 Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Primärreaktion von PR

In diesem Abschnitt werden zunächst die Probenpräparation und -charakterisierung vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der Kurzzeitmessungen und deren globale Analyse getrennt für den MIR und vis-Spektralbereich beschrieben. Die Diskussion erfolgt dann unter Einbeziehung aller vorliegenden Daten.

¹D97N: PR-Mutante, bei der das Aspartat (Einbuchstabencode: D) an Position 97 durch ein Asparagin (Einbuchstabencode: N) ersetzt wurde

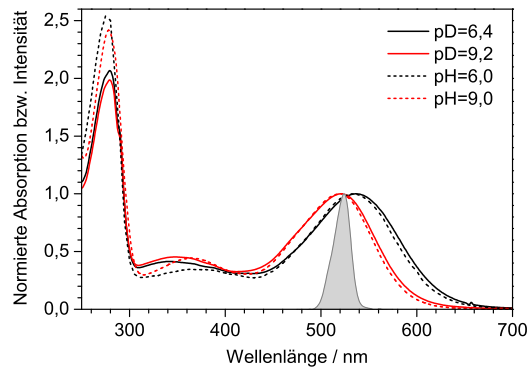


Abbildung 5.3: Absorptionsspektren von PR in D₂O und H₂O bei verschiedenen pH- bzw. pD-Werten, das Spektrum der NOPA-Anregungspulse ist in grau hinterlegt. Die Spektren wurden auf das Absorptionsmaximum des Retinals bei ca. 530 nm normiert und es wurde keine Streulichtkorrektur durchgeführt. Unterschiede im Bereich unterhalb von 400 nm sind auf die Probenpräparation zurückzuführen.

5.2.1 Probenpräparation

Sämtliche PR-Proben wurden in der Arbeitsgruppe Prof. C. Glaubitz von Ingrid Weber in *Escherichia Coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt wie in [242] beschrieben. Weitere Details finden sich auch in [243]. Vor den Messungen wurden die Proben in eine D₂O-Pufferlösung (500 mM NaCl, 0,1 % DDM², 20 mM TRIS³, pD = 9,2 bzw. pD = 6,4) überführt. Es ist zu beachten, dass das Ionenprodukt von D₂O größer ist als in H₂O. Dementsprechend gilt für eine neutrale D₂O-Lösung: pD ≈ 7,4 und für den Vergleich zwischen den Lösungsmitteln: pD = pH + 0,4. Der Austausch des Lösungsmittels und das Aufkonzentrieren der solubilisierten Probe erfolgte durch Zentrifugation in Centriprep Zentrifugalfiltern mit einer Durchlässigkeit bis zu einem Molekulargewicht von 10 kD (Millipore, Schwalbach).

5.2.2 pH-Abhängigkeit des UV/vis-Absorptionsspektrums

Das Absorptionsspektrum von PR (Abb. 5.3) zeigt in D₂O eine pH-abhängige Verschiebung der Absorptionsbande des Retinals: das Absorptionsmaximum liegt bei deprotoniertem Asp97 (pD = 9,2) bei $\lambda = 521$ nm und bei protoniertem (pD = 6,4) bei $\lambda = 537$ nm. Die Bandenpositionen reflektieren den jeweiligen Protonierungszustand des primären Protonenakzeptors Asp97, sie stimmen gut mit den in H₂O gemessenen Maxima überein [237, 238]. Offensichtlich hat der H/D-Austausch keinen signifikanten Einfluss auf das Absorptionsspektrum im sichtbaren Spektralbereich.

Der pK_S-Wert kann spektroskopisch aus einer pH-Titration bestimmt werden. Bei der Auftragung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums gegen den pH-Wert gilt am Wendepunkt der Kurve: pH = pK_S. Für die vorliegende Probe wurden so Werte

²DDM: *n*-Dodecyl- β -D-Maltosid

³TRIS: Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan

von $pK_S = 6,9$ [232] bis $pK_S(\text{Asp97}) = 7,3$ [244] ermittelt. Die korrekte Einstellung des Puffers wurde durch die Aufnahme von UV/vis-Absorptionsspektren vor jeder Messung kontrolliert.

5.2.3 Transiente Absorptionsspektroskopie im MIR-Bereich

Messbedingungen

Sämtliche Untersuchungen wurden mit der Rotationsküvette mit einer Schichtdicke von $50\ \mu\text{m}$ durchgeführt. Deren Rotations- und Translationsbewegung ist für den Probenaustausch ausreichend: Die Dauer des PR-Photozyklus beträgt $40\ \text{ms}$ [215], somit kann von einer vollständigen Regeneration der angeregten Probe vor einer erneuten Anregung desselben Volumens ausgegangen werden. Die Anregung der Proben erfolgte mit dem NOPA bei $525\ \text{nm}$ (vgl. Abb. 5.3), die Absorption der eingesetzten Proben bei dieser Wellenlänge lag zwischen $0,2$ und $0,3$.

Im Bereich bis $1\ \text{ps}$ wurde eine äquidistante Schrittweite benutzt ($\Delta t = 0,1\ \text{ps}$) und im Zeitbereich von $1\ \text{ps}$ bis $1,8\ \text{ns}$ wurden 70 Positionen mit exponentiell wachsendem Abstand angefahren. Die transienten Spektren wurden für Lösungen mit $pD = 9,2$ und $pD = 6,4$ mit paralleler Polarisation von Anregung und Abtastung im referenzierten Modus aufgenommen.

Es wurden sowohl in den Wellenzahlbereichen von $1680\ \text{cm}^{-1} - 1590\ \text{cm}^{-1}$ als auch von $1580\ \text{cm}^{-1} - 1500\ \text{cm}^{-1}$ jeweils beide Proben direkt nacheinander unter denselben Bedingungen gemessen, also ohne zwischenzeitliche Änderung des Strahlengangs oder Nachjustieren des optischen Aufbaus. Auf diese Weise wird der direkte Vergleich der Reaktionen bei verschiedenen pD -Werten ermöglicht. Zwischen $1580\ \text{cm}^{-1}$ und $1500\ \text{cm}^{-1}$ treten relativ große Differenzsignale auf, für diese Messungen wurden Anregungspulse mit $100\ \text{nJ}$ Pulsenergie verwendet. Die Signale zwischen $1680\ \text{cm}^{-1}$ und $1590\ \text{cm}^{-1}$ sind wesentlich geringer, deshalb wurde bei diesen Messungen die Pulsenergie der Anregung auf $400\ \text{nJ}$ erhöht, um ein vergleichbares Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen.

In beiden Messbereichen wurde zuvor der Zeitnullpunkt durch eine unabhängige Messung eines ZnSe-Substrates festgelegt wie in Abschnitt 3.4 auf S. 68 beschrieben. Durch die Aufnahme von Absorptionsspektren vor und nach den Kurzzeitexperimenten wurde sichergestellt, dass in deren Verlauf keine signifikante Degeneration der Probe auftrat.

Ergebnisse der Messungen

Abbildung 5.4 zeigt eine Übersicht der transienten Absorptionsänderungen für $pD = 6,4$ und $pD = 9,2$ bestehend aus den beiden Messbereichen. Die Zeitachse ist linear bis $1\ \text{ps}$ und logarithmisch für größere Werte, positive Signale werden in rot und negative in blau dargestellt. Die 2d-Darstellungen zeigen nur geringe pD -abhängige Unterschiede, was ebenfalls in den transienten Spektren verifiziert werden kann (Abb. 5.5).

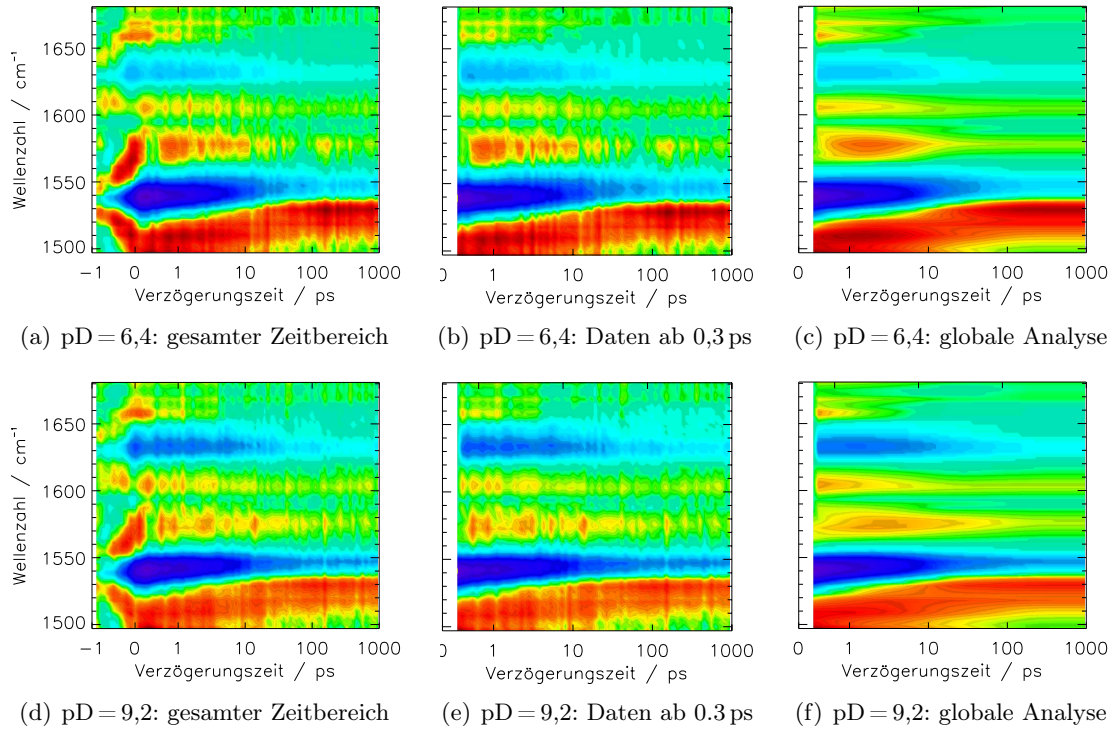


Abbildung 5.4: Transiente Absorptionsänderung von Proteorhodopsin bei pD = 6,4 und pD = 9,2 nach Anregung bei 525 nm bestehend aus jeweils zwei Einzelmessungen. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. In (a) und (d) ist die PFID-Signatur vor dem Zeitnullpunkt sowie die um den Zeitnullpunkt dominierende Kreuzphasenmodulation deutlich zu erkennen. In Abb. (b) und (e) wird nur der Zeitbereich ab 0,3 ps dargestellt, was zu einer besseren Farbskala führt. Die globale Anpassung mit vier Komponenten wird in (c) und (f) gezeigt.

Auftretende Effekte Bei negativen Verzögerungszeiten ist die charakteristische Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls (vgl. Abschnitt 3.3.1, S. 62) zu erkennen. Die Differenzsignale bei positiven Verzögerungszeiten entstehen durch die lichtinduziert ablaufende Reaktion. Am Zeitnullpunkt sind beide Effekte innerhalb der Kreuzkorrelationsbreite zusätzlich durch die Kreuzphasenmodulation überlagert (vgl. Abschnitt 3.3.4, S. 66). Die Größe der XPM konnte durch eine Messung des Puffers unter identischen Bedingungen abgeschätzt werden (siehe Abb. 3.18, S. 67). Außerdem wurde durch eine Anpassung des XPM-Signals mit geeigneten Modellfunktionen die Wellenzahlabhängigkeit des Zeitnullpunktes überprüft [147–150]. Die Dispersion innerhalb der einzelnen Messbereiche lag danach insgesamt unterhalb der verwendeten Schrittweite von 0,1 ps. Die weitere Analyse ergab, dass eine Korrektur der transienten Spektren durch Subtraktion der Signale des Puffers keine befriedigenden Ergebnisse lieferte.

Diese Störbeiträge sind bei Verzögerungszeiten von $t > 0,3$ ps zu vernachlässigen, in diesem Zeitbereich sind die Differenzsignale allein durch die induzierte Probedynamik bedingt. Entsprechend wurde die quantitative Auswertung der Daten nur im Zeitbereich

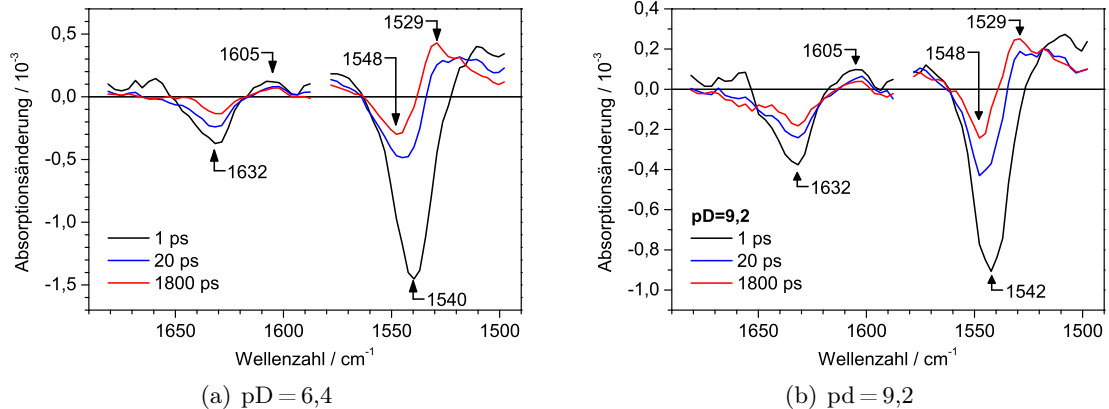


Abbildung 5.5: Vergleich der transienten Spektren im MIR von PR bei $\text{pD} = 6,4$ und $\text{pD} = 9,2$ bei ausgewählten Verzögerungszeiten. Die Spektren wurden nicht normiert: Unterschiede in den Amplituden der einzelnen Messbereiche lassen sich im Wesentlichen auf die Proteinkonzentrationen bzw. die Absorptionen bei der Anregungswellenlänge zurückführen.

von $t > 0,3 \text{ ps}$ durchgeführt. Dieser eingeschränkte Bereich sowie das Ergebnis der optimalen globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten werden ebenfalls in [Abbildung 5.4](#) dargestellt.

Probendynamik In den 2d-Grafiken in [Abbildung 5.4](#) ist kein signifikanter Unterschied des spektralen Verlaufs und der Zeitabhängigkeit zwischen den bei verschiedenen pD -Werten gemessenen Proben feststellbar, ebenso wie in den transienten Spektren ausgewählter Verzögerungszeiten in [Abb. 5.5](#). Die Unterschiede in den Amplituden der einzelnen Messreihen Bereich von 1580 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1} sind dabei auf unterschiedliche Probenkonzentrationen in diesen Messungen zurückzuführen.

Unmittelbar nach der Photoanregung ist ein strukturiertes Differenzspektrum zu erkennen. Die größten Signale liegen bei 1540 cm^{-1} ($-$), 1510 cm^{-1} ($+$) und 1630 cm^{-1} ($-$) und wesentlich kleinere bei 1656 cm^{-1} ($+$), 1605 cm^{-1} ($+$) und 1572 cm^{-1} ($+$). Innerhalb von ca. 100 ps ist allgemein ein Rückgang dieser Signale zu verzeichnen, wobei sich zum Teil auch Form und Lage der Banden verändern. Danach wird ein metastabiler Zustand erreicht und die transienten Differenzspektren bleiben bis zur maximalen Verzögerungszeit von $1,8 \text{ ns}$ praktisch konstant, wie sich gut in den ausgewählten Transienten ([Abb. 5.6](#)) nachvollziehen lässt. Dieses konstante Signal bei langen Verzögerungszeiten stellt die Differenz aus den nach der *13-cis*-Isomerisierung des Retinals neu entstandenen Schwingungsbanden und den ausgebleichten Banden des depopulierten all-*trans*-Retinals dar. Es repräsentiert also das Differenzspektrum des ersten Grundzustandsintermediats des Photozyklus (PR_K) und des PR-Grundzustands: das PR_K -PR-Differenzspektrum.

Die dominierende Bleichbande bei 1540 cm^{-1} zeigt bei negativen Zeiten deutlich die PFID-Signatur, die charakteristisch für die Schwingungsmoden des durch die elektronische Anregung gestörten chromophoren Systems ist (vgl. [Abschnitt 3.3.1](#), S. 62). Auf

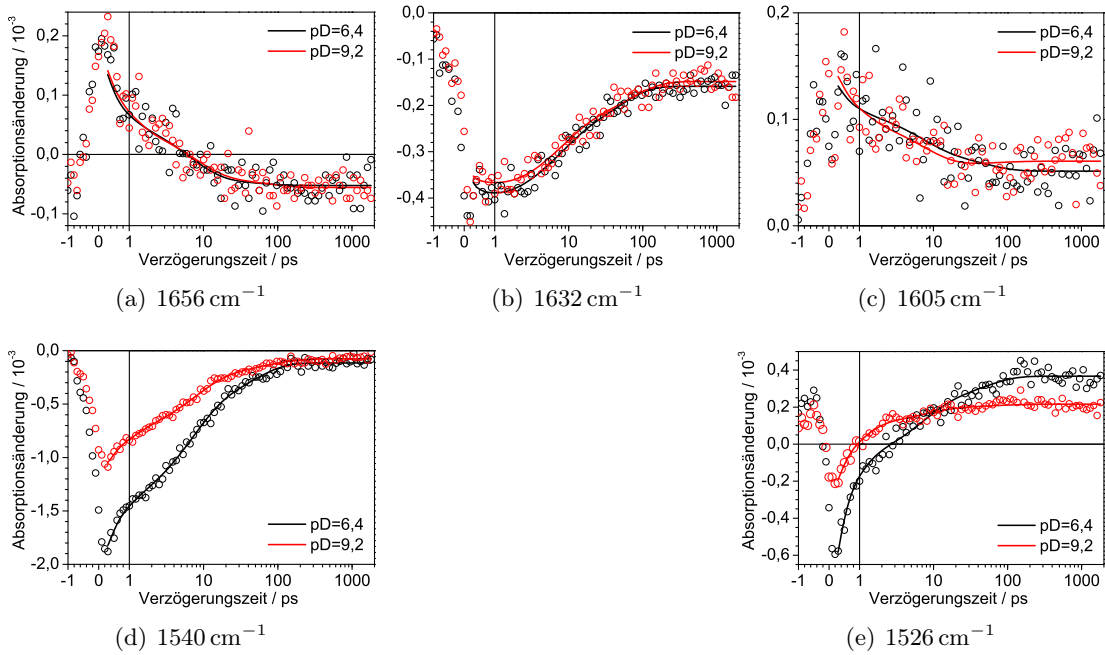


Abbildung 5.6: Transienten ausgewählter Wellenzahlen von PR bei beiden pD-Werten. Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung als Linien dargestellt.

der Basis publizierter FTIR-Studien [215, 245, 246] kann sie der C=C-Streckschwingung der konjugierten Kohlenstoffkette des Retinals zugeordnet werden. Für diese ist in verschiedenen Retinalproteinen ein linearer Zusammenhang zwischen ihrer Wellenzahl ($\tilde{\nu}_{C=C}$) und dem Absorptionsmaximum des Retinals im Sichtbaren (λ_{vis}) beschrieben worden [247, 248]: $\partial\lambda_{\text{vis}}/\partial\tilde{\nu}_{C=C} \approx -4 \text{ nm/cm}^{-1}$. Die hier auftretende pD-abhängige Verschiebung des Minimums der Differenzbande um einen Detektorkanal ($\approx 3 \text{ cm}^{-1}$) stimmt danach gut mit der Verschiebung der Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich überein (Abb. 5.3). Entsprechend der im Sichtbaren unmittelbar nach der Anregung auftretenden Rotverschiebung (vgl. Abb. 5.8, S. 119) kann außerdem die positive Absorptionsänderung bei 1510 cm^{-1} der C=C-Streckschwingung angeregter Retinale zugeschrieben werden. Innerhalb von 100 ps erfährt die negative Bande eine Blauverschiebung des Minimums von 1540 cm^{-1} auf 1548 cm^{-1} , gleichzeitig geht die Signalamplitude auf etwa ein Viertel und die Halbwertsbreite auf die Hälfte zurück. Die positive C=C-Produktbande (1510 cm^{-1}) zeigt ebenfalls eine Blauverschiebung ihres Maximum auf 1529 cm^{-1} , dabei ändert sich die Bandenform deutlich während die Amplitude konstant bleibt.

Im Bereich von $1680 \text{ cm}^{-1} - 1590 \text{ cm}^{-1}$ ist innerhalb der ersten 100 ps ebenfalls ein Rückgang der Signale bei 1632 cm^{-1} (-) und 1605 cm^{-1} (+) um etwa 50 % zu beobachten während die Breite und Bandenform im Rahmen der experimentellen Auflösung unverändert bleiben. Die Bleichbande bei 1632 cm^{-1} kann aufgrund ihrer PFID-Signatur ebenfalls

einer Retinalbande zugeordnet, nämlich der C=N-Streckschwingung der protonierten bzw. deuterierten Schiffischen Base [245, 246, 249]: Aufgrund der starken Kopplung der C=N-Mode an die C–H- bzw. C–D-Schwingung ist diese stark solvensabhängig und da die Proben in D₂O vorlagen ist hier von einem quantitativen H/D-Austausch auszugehen.

Das ursprünglich positive Signal bei 1656 cm⁻¹ verschwindet innerhalb weniger Pikosekunden und geht in eine negative Absorptionsänderung über, deren Amplitude ab etwa 100 ps konstant bleibt. Da diese negative Differenzbande erst bei langen Verzögerungszeiten auftritt und zudem keinen PFID-Effekt zeigt, ist sie keiner direkt durch die Anregung beeinflussten Schwingungsmode des Retinals zuzuschreiben. Die Lage der Bande und das verzögerte Ausbleichen lässt eine Reaktion der Retinalbindetasche auf die Isomerisierung des Chromophors vermuten, die zu einem Ausbleichen der Amid I-Mode des Proteinrückgrats führt. Ähnlich schnelle Proteinantworten im Amid I-Bereich wurden auch in Anreg-/Abtastexperimenten an BR in H₂O nachgewiesen [250, 251]. Zudem bestätigen mittels FTIR aufgenommene PR_K–PR-Differenzspektren, die vergleichbare Banden aufweisen, diese Zuordnung zu den Schwingungsmoden des Proteinrückgrats [245, 246, 249].

Globale Analyse

Nachdem für pD = 6,4 und pD = 9,2 jeweils beide Messreihen zu einem Datensatz zusammengefasst wurden, erfolgte die globale Analyse für $t > 0,3$ ps mit jeweils drei, vier und fünf Zeitkonstanten. Während die letzte Zeitkonstante auf den Wert ∞ festgelegt war, um das konstante Differenzspektrum bei langen Verzögerungszeiten zu modellieren, wurden die übrigen als freie globale Parameter angepasst. Tabelle 5.1 fasst die erzielten Ergebnisse zusammen, der Parameter χ^2 stellt dabei ein Maß für die Abweichungen der angepassten Funktion von den Daten dar.

Trivialerweise liefert eine größere Anzahl von Zeitkonstanten besser angepasste Kurven, allerdings fällt die Abnahme des χ^2 -Wertes beim Vergleich von vier mit fünf Zeitkonstanten wesentlich geringer aus, als beim Vergleich von drei mit vier. Die zusätzliche

pD-Wert	τ_1 /ps	τ_2 /ps	τ_3 /ps	τ_4 /ns	τ_5	$\chi^2/10^{-6}$
6,4	1,2	17	∞	–	–	5,91
6,4	0,5	6	46	∞	–	5,01
6,4	0,4	6	40	3,2	∞	4,91
9,2	1,1	17	∞	–	–	3,20
9,2	0,6	7	66	∞	–	2,84
9,2	0,6	7	54	4,8	∞	2,76

Tabelle 5.1: Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung der transienten IR-Spektren von PR bei verschiedenen pD-Werten. Die Daten wurden für beide pD-Werte jeweils mit drei, vier und fünf Zeitkonstanten angepasst. Der Parameter χ^2 ist ein Maß für die Abweichung der angepassten Funktion von den Daten.

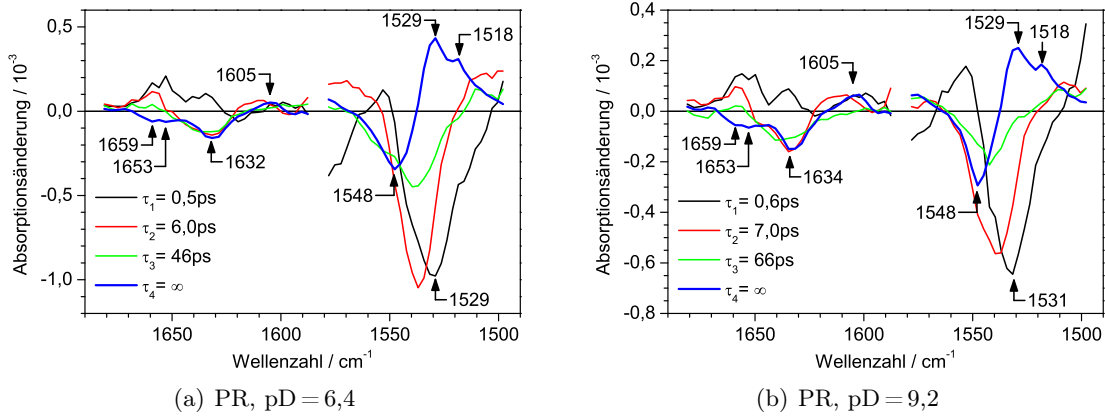


Abbildung 5.7: Zerfallsspektren von PR bei verschiedenen pD-Werten für die globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten.

Zerfallszeit bei der Anpassung von fünf Zeitkonstanten liegt bei einigen Nanosekunden, ist also deutlich größer als die maximale Verzögerungszeit. Dabei wird nur das zerfallsspektren der Komponente $\tau = \infty$ verändert, die Werte und DAS von τ_1 bis τ_3 entsprechen denen bei Anpassung von vier Zeitkonstanten. Der zusätzliche Freiheitsgrad führt hier also lediglich zu einer artifiziellen Aufspaltung der Langzeitkomponente $\tau := \infty$. Umgekehrt kommt es bei Anpassung mit drei Komponenten noch zu geringen aber systematischen Abweichungen der Kurven von den Daten. Obwohl alle im Folgenden diskutierten Merkmale bei dieser Variante bereits vorhanden sind, reicht die Anzahl der Parameter nicht zu einer optimalen Beschreibung der Messwerte aus [243]. Demzufolge werden beide Datensätze durch eine Summe aus vier Exponentialfunktionen optimal modelliert. Die Qualität der Anpassung kann anhand der Transienten in Abb. 5.6 verifiziert werden.

Die Eindrücke, dass die im Infraroten gemessenen transienten Spektren beider pD-Werte dieselbe Zeitabhängigkeit aufweisen, wird bestätigt. In allen Varianten werden stets nur geringe Abweichungen zwischen den Zerfallszeiten saurer und alkalischer Lösungen gefunden. Eine weitere Analyse der optimalen Anpassung mit vier Komponenten zeigt, dass auch die DAS der beiden pD-Werte eine sehr gute Übereinstimmung zeigen. Unterschiede ergeben sich im Wesentlichen aufgrund der mit der Probenkonzentration variierenden Gesamtamplitude sowie der pD-abhängigen Verschiebung der Wellenzahl der C=C-Schwingungsmode des Retinals. Deswegen wird die globale Analyse unabhängig vom pD-Wert diskutiert.

Die Komponente $\tau_4 := \infty$ beschreibt die bei langen Verzögerungszeiten konstanten Signale, welche dem Differenzspektrum des ersten Grundzustandsintermediats $\text{PR}_K - \text{PR}$ zuzuordnen sind. Im Bereich der C=C-Schwingung zeigen sich zwei dominante Banden bei 1548 cm^{-1} (-) und 1529 cm^{-1} (+) sowie eine Schulter bei 1518 cm^{-1} (+). In bereits veröffentlichten $\text{PR}_K - \text{PR}$ -Spektren variieren die genauen Positionen dieser Banden

abhängig von Probenpräparation und pH-Wert im Bereich von 1546 cm^{-1} bis 1538 cm^{-1} (–) bzw. von 1523 cm^{-1} bis 1514 cm^{-1} (+) [187, 215, 223, 245, 249, 252]. Es ist kein PR_K –PR Spektrum in D_2O bei Raumtemperatur publiziert, das den direkten Vergleich mit diesem sehr frühen K-Intermediat erlaubt. In Anbetracht der unterschiedlichen Messmethoden und -bedingungen entsprechen die vorliegenden Ergebnisse dennoch sehr gut dem PR_K –PR-Spektrum, das in D_2O in Tieftemperaturexperimenten aufgenommen wurde [245]. Die Schulter bei 1518 cm^{-1} wird zwar in anderen Veröffentlichungen ebenfalls deutlich aufgelöst [252] – eine Zuordnung findet sich in der Literatur bis dato jedoch nicht. Mit Hilfe der genannten Veröffentlichungen können die Banden bei 1632 cm^{-1} (–) und 1605 cm^{-1} der PR_K –PR-Signatur der C=N-Schwingung der protonierten Schiffischen Base in D_2O zugeordnet werden. Hier ist zu bedenken, dass die Wellenzahl dieser Bande aufgrund der Kopplung von C=N- und N–H- bzw. N–D-Mode nach dem H/D-Austausch um ca 22 cm^{-1} im Vergleich zu den in Wasser aufgenommenen Differenzspektren verschoben ist. Die negative Bande bzw. Schulter bei 1656 cm^{-1} entspricht ebenfalls den Ergebnissen der FTIR-Experimente und wurde auch in transienten Spektren von BR gefunden [250, 251]. Die Wellenzahl dieses Bleichsignals ist typisch für die Amid I-Bande des Proteinrückgrats. Daher wird dieses Signal einer strukturellen Änderung des Proteins als Reaktion auf die Anregung bzw. Isomerisierung des Retinals zugeordnet [250, 251].

Eine eindeutige Zuordnung der kürzeren Zeitkonstanten (τ_1 bis τ_3) zu diskreten molekularen Prozessen ist hier nicht möglich. Nach dem bisherigen Kenntnisstand ist folgendes Reaktionsmodell anzunehmen [237, 238]: Mit der Anregung in die Franck-Condon-Region kommt es zur intramolekularen Schwingungsenergieumverteilung innerhalb des S_1 -Zustands und somit zur Anregung gekoppelter niederfrequenter Schwingungsmoden was im Prinzip einer Erhöhung der molekularen Temperatur entspricht. Auch bei dem $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang wird die Überschussenergie in Wärme umgewandelt und führt zu heißen Retinalen sowohl in all-*trans*- als auch in 13-*cis*-Konfiguration. Die Kopplung an die Umgebung ermöglicht eine Abkühlung der Moleküle. Aufheizen und Abkühlen sind dabei stets mit Veränderungen der Position und inhomogenen Linienbreite der beobachteten hochfrequenten Schwingungsmoden verbunden. Zusammen mit der biexponentiellen Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands des Retinals in PR ist daher die Beobachtung einer komplexen Reaktionsdynamik zu erwarten, die sich nicht direkt mit Hilfe eines exponentiellen Ratenmodells wiedergeben lässt. Selbst im einfachsten Fall eines monoexponentiellen Kühlprozesses können daraus nicht-exponentelle Zerfallskinetiken in den einzelnen Transienten resultieren, wie z. B. für Azobenzol explizit nachgewiesen wurde [62]. Für die protonierte Schiffische Base von all-*trans*-Retinal in Lösung wurde eine intramolekulare Temperatur von 550 K direkt nach dem $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang ermittelt, die anschließende Abkühlung erfolgte mit etwa 50 ps [63].

Trotz der Einschränkungen bei der Interpretation der kinetischen Parameter in Hinblick auf die molekularen Vorgänge lassen sich weitere Aussagen aus der globalen Analyse ableiten. Zudem stellt diese Form der Analyse ein Standardverfahren dar, das unabhängig vom zugrundegelegten Reaktionsmodell den Vergleich mit weiteren Messungen an PR [253–255] oder auch anderen Retinalproteinen [250, 251, 256, 257] ermöglicht.

Die zerfallassozierten Spektren zu τ_2 und τ_3 zeigen zwei ausgeprägte Minima bei

1632 cm^{-1} und $\approx 1540 \text{ cm}^{-1}$, deren Position und Linienbreite gut mit dem instantanen Bleichsignal der C=N- bzw. C=C-Mode übereinstimmen. Diese Zerfallskomponenten modellieren also im Wesentlichen einen biexponentiellen Rückgang der ursprünglichen Bleichsignals bzw. eine Repopulation des Ausgangszustands. Entsprechend werden beide einem Kühlprozess zugeschrieben.

Im Amid I-Bereich bei 1660 cm^{-1} besitzen die DAS zu τ_2 und τ_3 positive Amplituden, wobei die zum langsameren Prozess τ_3 deutlich geringer ist und nahezu verschwindet. Beide tragen also mit unterschiedlichem Gewicht zu der Ausbildung des negativen Signals bei, welches folglich eine grundlegend andere Zeitabhängigkeit aufweist als die unmittelbar ausgebleichten Banden der C=N- und C=C-Mode. Diese Erkenntnis stützt die Annahme, dass eine strukturelle Änderung des Proteingerüsts infolge der Isomerisierung dieses Signal verursacht.

Das DAS der kürzesten Zeitkonstanten τ_1 unterscheidet sich grundsätzlich von den bisher diskutierten. Dieser Prozess ist folglich nicht mit der Wiederbesetzung des ursprünglichen PR-Grundzustands verbunden. Im C=C-Bereich wird dies besonders deutlich: Das Minimum (1529 cm^{-1} bei pD = 9,2 und 1531 cm^{-1} bei pD = 6,4) liegt auf der Wellenzahl des Maximums der positiven Produktbande des PR_K-PR-Differenzspektrums. Auch im Bereich der positiven Schulter des PR_K-PR-Spektrum bei 1518 cm^{-1} ist das DAS der Komponente τ_1 negativ, während τ_2 und τ_3 nicht zur Bildung dieser Bande beitragen. Der Einfluss dieses schnellen Prozesses auf die Produktbildung kann gut in den Transienten bei 1526 cm^{-1} verifiziert werden (Abb. 5.6(e)). Dieselbe Argumentation greift auch für die positiven Produktbanden bei $\tilde{\nu} > 1570 \text{ cm}^{-1}$ (pD = 6,4) bzw. $\tilde{\nu} > 1564 \text{ cm}^{-1}$ (pD = 9,2). Für die Bildung der negativen PR_K-PR-Banden infolge der Isomerisierung lassen sich keine vergleichbare Belege finden, da diese durch die unmittelbaren Bleichsignale sowie die Kühlprozesse verdeckt werden.

Im Bereich der C=N-Streckschwingung finden sich keine Anhaltspunkte für die Bildung positiver Produktsignale mit der Komponente τ_1 . Die unmittelbar mit der Anregung entstehenden positiven Signale sind zunächst dem elektronisch angeregten Zustand zuzuordnen und ihr Zerfall überlagert die übrigen Prozesse. Zudem ist in diesem Bereich aufgrund der geringen Amplitude des PR_K-PR-Spektrums und des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses insbesondere das DAS der kürzesten Zeitkonstanten mit größeren Fehlern behaftet, wie man in der Transiente bei 1605 cm^{-1} sehen kann (Abb. 5.6(c)). Interessanterweise ist ein deutlicher Beitrag des τ_1 -Prozesses zur Entstehung der negativen Signale der C=N-Mode bei 1632 cm^{-1} und auch der Amid I-Mode des Proteins bei 1660 cm^{-1} erkennbar. Insgesamt ist also auch für diesen Messbereich festzustellen, dass die schnellste Komponente τ_1 mit dem Aufbau des PR_K-PR-Spektrums verknüpft ist.

Allerdings stellt das zerfallassozierte Spektrum zu τ_1 kein Spiegelbild des Produktspektrums dar, so dass der zugrundeliegende Prozess nicht exklusiv der Population des PR_K-Intermediates zugeordnet werden kann: Zu beachten ist die partielle Rückreaktion in den all-*trans*-Grundzustand des Retinals sowie die Population von hoch-schwingungsangeregten all-*trans*- und 13-*cis*-Molekülen. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der Produktbildung bereits innerhalb weniger hundert Femtosekunden erfolgt und entsprechend in diesem Experiment bzw. in der globalen Analyse nicht aufgelöst wird.

5.2.4 Transiente Absorptionsspektroskopie im vis-Bereich

Diese Messungen wurden von Mirka-Kristin Verhoefen mit einem bereits bestehenden experimentellen Aufbau durchgeführt. Auf eine Beschreibung der technischen Details dieser Apparatur muss verzichtet werden, es sei auf die ausführlichen Darstellungen in anderen Dissertationen verwiesen [244, 258]. Hier wird nur eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Daten gegeben.

Grundsätzlich handelt es sich ebenfalls um ein Anreg-/Abtastexperiment auf Basis des Clark CPA 2001 Femtosekundenverstärkersystems. Anregungspulse werden mittels NOPA und gefaltetem Prismenkompressor generiert, wie in Abschnitt 3.1.2 ab Seite 29 dargestellt. Als Abtastpuls dient spektral breitbandiges Weißlicht, das durch Fokussierung der Laserfundamentalen mit einigen Mikrojoule Pulsenergie in ein 2,3 mm dickes Saphirsubstrat entsteht. Über einen dünnen teilreflektierenden Auskoppelspiegel werden 98 % der verbleibenden Laserfundamentalen aus dem Weißlichtspektrum herausgefiltert, bevor der Abtaststrahl mit einem weiteren Strahlteiler in Signal- und Referenzstrahl aufgeteilt wird. Über einen Off-Axis-Paraboloiden werden Anreg- und Abtastpuls in die Probenzelle fokussiert und dahinter mit einer Linse wieder kollimiert. Beide Foki werden in der Küvette räumlich überlagert, wobei der Durchmesser des Abtaststrahls geringer ist, als der der Anregung ($\approx 100 \mu\text{m}$). Der Referenzstrahl wird nicht durch die Probe geführt.

Die Detektion von Signal- und Referenzspektrum erfolgt in zwei identischen Spektrometern, die jeweils über eine 42-fach Photodiodenzeile verfügen. Eine schnelle Analog/Digital-Wandlerkarte erlaubt die Digitalisierung aller Werte in Echtzeit bei einer Repetitionsrate von 1 kHz. Bei den verwendeten Gittern liegt der mittlere Kanalabstand bei 8 nm, dementsprechend kann der gesamte sichtbare Spektralbereich simultan abgetastet werden. Die Verwendung von zwei synchronisierten, phasenverschobenen Unterbrecherrädern im Anreg- und Abtaststrahlengang gestattet eine rauscharme, referenzierte Messung der Absorptionsänderung zusammen mit einer effizienten Unterdrückung von Streulichtbeiträgen der Anregung.

Messbedingungen

Es wurde eine kommerzielle Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von $100 \mu\text{m}$ verwendet, diese wurde lateral in x - und y -Richtung bewegt, um einen ausreichenden Probenaustausch zwischen den einzelnen Laserpulsen zu erreichen. Die Anregung der Proben erfolgte mit einem NOPA bei 525 nm mit 50 nJ Pulsenergie, die Absorption der eingesetzten Proben bei dieser Wellenlänge lag bei 0,5. Abgetastet wurde im Spektralbereich von 430 nm bis 750 nm mit paralleler Orientierung der Polarisierungen von Anregung und Abtastung.

Im Bereich bis etwa 1 ps wurde eine äquidistante Schrittweite benutzt ($\Delta t \approx 30 \text{ fs}$) und im Zeitbereich von 1 ps bis 1,5 ns wurden die Verzögerungszeiten mit exponentiell wachsendem Abstand angefahren.

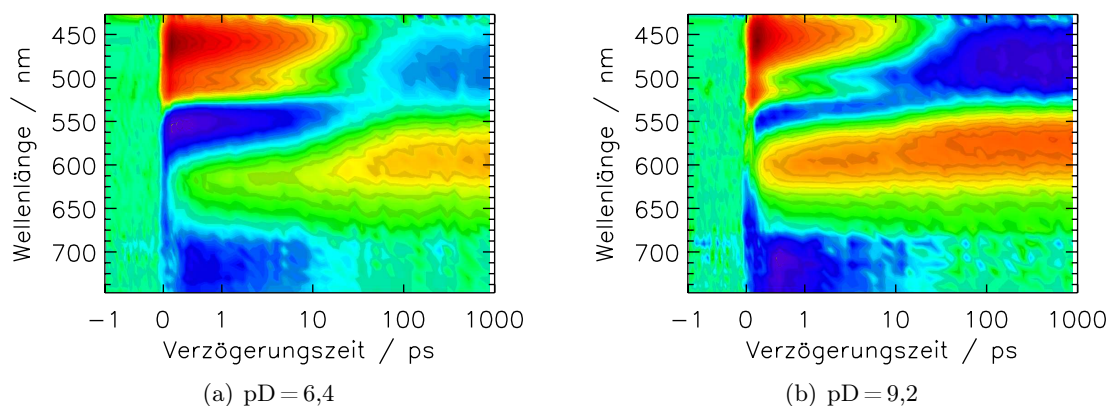


Abbildung 5.8: Transiente Absorptionsänderung von PR in D_2O im vis-Bereich nach Anregung bei 525 nm bei unterschiedlichen pD-Werten. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten.

Zusätzlich zu den PR Proben bei $pD = 6,4$ und $pD = 9,2$ wurde unter jeweils identischen Bedingungen das Signal der Pufferlösung in der Nähe des Zeitnullpunktes gemessen. Dieses diente der Korrektur von Lösungsmittelbeiträgen, wie dem kohärenten Artefakt infolge der Kreuzphasenmodulation, was hier im Gegensatz zu Experimenten im MIR problemlos möglich ist. Die kohärenten Signale können mit geeigneten Modellfunktionen angepasst werden und aus den Anpassungsparametern können der wellenlängenabhängige Zeitnullpunkt und die Zeitauflösung des Experiments bestimmt werden [140, 147–150]. Die Dispersion wurde anschließend rechnerisch korrigiert und die Kreuzkorrelationsbreite war $< 0,15$ ps.

Ergebnisse der Messungen

Abbildung 5.8 zeigt die 2d-Grafiken der transienten Absorptionsänderung von PR im Sauren und Alkalischen, die Farbkodierung ist dieselbe wie bei den 2d-Grafiken des MIR-Bereiches. Beide Datensätze wurden hinsichtlich der Dispersion und der kohärenten Effekte des Lösungsmittels am Zeitnullpunkt wie oben beschrieben korrigiert. Die spektralen Charakteristika entsprechen denen rekonstituierter oder solubilisierter PR-Proben in H_2O , daher lassen sich die Ergebnisse im Rahmen der bestehenden Literatur zuordnen [237, 238].

Unmittelbar mit der Photoanregung entsteht eine Reihe von Differenzsignalen, die pD-abhängig innerhalb von etwa 50 ps zerfallen und die der Besetzung des elektronisch angeregten Zustands sowie der Entvölkerung des elektronischen Grundzustands zuzuordnen sind. Die Absorption aus dem elektronisch angeregten Zustand führt bei beiden pD-Werten zu einem positiven Differenzsignal mit einem Maximum bei 450 nm. Die negative Bande bei $\lambda > 700$ nm kann der stimulierten Emission und damit ebenfalls der Population des S_1 zugeordnet werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Messungen findet sich im Signal des ausgebleichten Grundzustands, da die Lage der

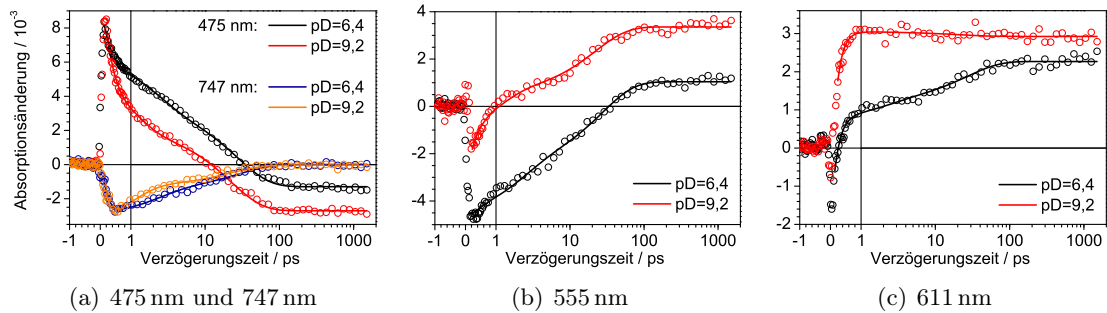


Abbildung 5.9: Transienten ausgewählter Wellenlängen von PR bei beiden pD-Werten. Gezeigt sind Wellenlängen aus dem Bereich der Absorption des elektronisch angeregten Zustands und der stimulierten Emission (a), des ausgebleichten Grundzustands (b) und der Absorption des PR_K -Intermediates (c). Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung als Linien dargestellt.

Absorptionsbande des Retinals in PR vom pD-Wert abhängt (Abb. 5.3, S. 109). Das Grundzustandsbleichsignal tritt bei $\text{pD} = 6,4$ als prominente negative Bande zwischen 530 nm und 600 nm auf. Bei $\text{pD} = 9,2$ ist es blauverschoben und wird von der Absorption des angeregten Zustands größtenteils kompensiert, so dass nur eine kleine negative Bande um 540 nm beobachtet wird. Während die Absorption des angeregten Zustands und das Bleichsignal des Grundzustands unmittelbar nach der Anregung die größten Amplituden besitzen, zeigt sich im Bereich der stimulierten Emission ein etwas verzögerter Aufbau des Signals. Die anschließende Zerfallskinetik ist jedoch für alle diese Beiträge nahezu identisch, wie anhand der Transienten bei 475 nm, 555 nm und 747 nm in Abbildung 5.9 verifiziert werden kann.

Nach dem Abklingen der Signale des elektronisch angeregten Zustands tritt ab etwa 100 ps ausschließlich das PR_K -PR-Differenzspektrum auf, welches bis zur maximalen Verzögerungszeit von 1,5 ns praktisch konstant bleibt. Dessen Signatur besteht aus einer negativen Bande um 490 nm, entsprechend der Depopulation des all-*trans*-Zustands des Retinals in PR und einer positiven Bande, entsprechend der Absorption des 13-*cis*-Zustands des Retinals im PR_K -Intermediat. Die genaue Lage und Amplitude dieser Differenzbanden hängt vom pD-Wert ab und ihre Entstehung ist bereits innerhalb der ersten Pikosekunde eindeutig nachzuweisen, wie auch die Transiente bei 611 nm zeigt (Abb. 5.9(c)). Dabei liegt die positive Produktbande bei $\text{pD} = 9,2$ nahezu isoliert, während sie bei $\text{pD} = 6,4$ innerhalb der ersten zehn Pikosekunde durch das negative Signal des ausgebleichten Grundzustands überlagert wird.

Globale Analyse

Die quantitative Auswertung erfolgte mittels der globalen Analyse im Zeitbereich $t \geq 0,15$ ps, um eine Störung durch unkorrigierte kohärente Effekte zu vermeiden. Für eine optimale Modellierung der Datensätze ist ebenso wie bei den Messungen in H_2O die Verwendung von vier Zeitkonstanten erforderlich. Dabei wurde eine zur Modellierung

Probenpräparation	τ_1/ps	τ_2/ps	τ_3/ps	τ_4
D ₂ O, solubilisiert, pD = 6,4	< 0,15	1,6	25	∞
H ₂ O, solubilisiert, pH = 6,4	0,15	1,0	16,2	∞
H ₂ O, rekonstituiert, pH = 6,0	< 0,2	0,7	15	∞
D ₂ O, solubilisiert, pD = 9,2	< 0,15	0,7	21	∞
H ₂ O, solubilisiert, pH = 9,0	0,14	0,28	9,5	∞
H ₂ O, rekonstituiert, pH = 9,0	< 0,2	0,4	8	∞

Tabelle 5.2: Vergleich der Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung der transienten vis-Spektren von PR in unterschiedlich präparierten sauren und alkalischen Lösungen. Die Daten für H₂O wurden der Literatur entnommen [237, 238].

des PR_K–PR -Spektrums bei langen Verzögerungszeiten festgesetzt ($\tau_4 := \infty$) und die übrigen wurden als freie Parameter global angepasst. Die ermittelten Zeitkonstanten der hier durchgeführten Messung in D₂O werden in Tabelle 5.2 zusammengefasst und mit den Literaturwerten für Messungen an rekonstituiertem und solubilierten PR in H₂O verglichen. Die Werte für τ_2 und τ_3 sind etwa doppelt so groß wie die für PR in H₂O bestimmten Zeitkonstanten [238]. Das lässt sich auf einen kinetischen Isotopeneffekt infolge des H/D-Austausches zurückführen und stimmt mit Arbeiten von Szakács und Mitarbeitern überein [259]. Diese haben in kinetischen Untersuchungen der ionentransportierenden Retinalprotein BR, HR und PR einen Isotopeneffekt im Bereich von 1,5 bis 2 für diejenigen Übergänge gefunden, die nicht mit großen Umordnungen von Wasserstoffbrücken verbunden sind.

Abbildung 5.10 zeigt die zerfallassozierten Spektren für die Daten beider pD-Werte. Die DAS zu τ_2 und τ_3 ähneln einander und weisen die charakteristischen Merkmale der Absorption des angeregten Zustands, des ausgebleichten Grundzustands und der stimulierten Emission auf. Damit können diese Zeitkonstanten einer biexponentiellen Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands zugeordnet werden. Diese biexponentielle Kinetik entspricht der Verzweigung des Reaktionspfades auf der S_1 -Fläche in einen schnellen, direkten (τ_2) und einen langsameren, kinetisch gehemmten (τ_3) Reaktionskanal. Beim Übergang in den elektronischen Grundzustand wird durch beide Reaktionskanäle sowohl die 13-*cis*- als auch die all-*trans*-Konfiguration des Retinals gebildet. Die pD-Abhängigkeit der Reaktion zeigt sich in den DAS ebenso wie bei den Messungen in H₂O durch eine Umkehr der Amplitudenverhältnisse: Während bei pD = 6,4 die langsamere Komponente τ_3 die größeren Amplituden aufweist, ist es bei pD = 9,2 die schnellere Komponente τ_2 . Dementsprechend ist im Alkalischen (deprotoniertes Asp97) der schnellere, direkte Reaktionspfad bevorzugt, während im Sauren (protoniertes Asp97) der größere Anteil über den langsameren Kanal reagiert.

Das zerfallassozierte Spektrum zu τ_4 entspricht dem bekannten PR_K–PR-Differenzspektrum und besteht aus der negativen Bande des ausgebleichten Grundzustands und der positiven des rotverschoben zum Grundzustand absorbierenden PR_K-Intermediates.

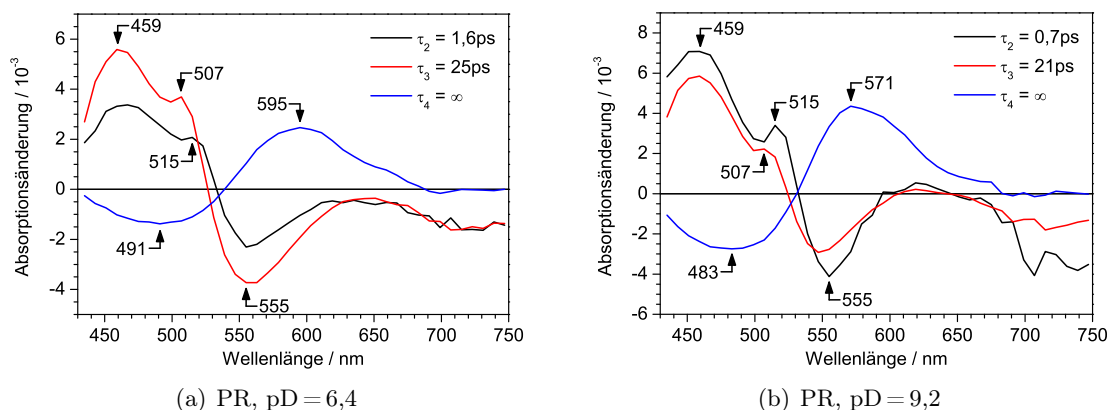


Abbildung 5.10: Zerfallsspektren von PR bei verschiedenen pD-Werten für die globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten. Das DAS der kürzesten Zeitkonstante $\tau_1 < 0,15$ ps wird nicht gezeigt.

Auch hier zeigt sich eine deutliche pD-Abhängigkeit der Amplituden. Aufgrund der starken pD-Abhängigkeit des Absorptionsspektrums von PR kann nicht a priori auf eine entsprechende Änderung der Isomerisierungsquantenausbeute geschlossen werden: eine stärkere spektrale Überlappung der negativen Grundzustandsbande mit der positiven Produktabsorption würde ebenfalls zu geringeren Differenzsignalen führen. Die im IR gewonnenen Daten geben hier weitere Hinweise, die Diskussion erfolgt daher für beide Messungen zusammen im nächsten Abschnitt ab S. 125.

5.2.5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transiente Spektren im infraroten und sichtbaren Spektralbereich unter vergleichbaren Bedingungen mit hoher Zeitauflösung aufgenommen. Neben den direkt aus den einzelnen Datensätzen extrahierten Informationen bieten vor allem die Vergleiche zwischen den Messungen bei unterschiedlichen pD-Werten, Lösungsmitteln und Spektralbereichen neue Ansätze zur Charakterisierung der Primärreaktion.

Kinetische Parameter

Die Interpretation der erzielten Messergebnisse erfolgt im Rahmen des für PR vorgeschlagenen Reaktionsmodells [237, 238] und damit im Einklang mit anderen Untersuchungen der Reaktionsdynamik archaer Retinalproteine im sichtbaren [260–263] sowie im infraroten Spektralbereich [244, 250, 253, 256, 257, 264, 265]: Danach relaxieren die angeregten Retinale durch intra- und intermolekulare Schwingungsenergieumverteilung innerhalb weniger hundert Femtosekunden, was sich als Bewegung des Wellenpakets aus der Franck-Condon-Region heraus veranschaulichen lässt. Auf Grundlage der für BR durchgeführten Modellrechnungen [241] sowie experimenteller Arbeiten [266, 267] wird als initiale Reaktionskoordinate die C=C-Streckschwingung der konjugierten Kohlenstoffkette des Retinals angegeben. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Torsion um die

C₁₃–C₁₄-Bindung des Retinals, wodurch eine konische Durchschneidung mit dem elektronischen Grundzustand erreicht wird. Der bei PR gefundene biexponentielle Zerfall des elektronisch angeregten Zustands wird mit einer Verzweigung des Reaktionspfades auf der S_1 -Fläche erklärt, entsprechend zwei verschiedenen Deaktivierungskanälen. Ein Teil der Moleküle erreicht die konische Durchschneidung direkt, während der Rest in einem flachen Potentialminimum des angeregten Zustands endet und daher eine längere S_1 -Lebensdauer aufweist. Bei beiden Reaktionswegen wird beim Übergang in den Grundzustand sowohl die ursprüngliche all-*trans*- als auch die isomerisierte 13-*cis*-Konfiguration des Retinals gebildet.

Im Folgenden werden die aus der globalen Analyse im sichtbaren und infraroten Spektralbereich ermittelten Komponenten in das Reaktionsmodell eingeordnet.

vis Durch die globale Analyse der im sichtbaren Spektralbereich gemessenen transienten Absorptionsänderungen wurden vier Zeitkonstanten ermittelt, was mit vergleichbaren Experimenten an PR in H₂O übereinstimmt [237, 238]. Somit können die einzelnen Komponenten der globalen Analyse direkt im Sinne des oben dargestellten Reaktionsschemas interpretiert werden.

Die kürzeste Zeitkonstante τ_1 liegt im Bereich der Zeitauflösung und wird der Bewegung aus der Franck-Condon-Region und der Schwingungsenergieumverteilung im S_1 -Zustand zugeschrieben. Es ergeben sich keine Hinweise, dass dieser Prozess durch den Protonierungszustand oder die Wahl des Lösungsmittels (H₂O/D₂O) beeinflusst wird.

Die Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 entsprechen der Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands über den schnellen, direkten oder den langsamen, kinetisch gehemmten Reaktionspfad. Beide sind deutlich größer als die für PR in H₂O ermittelten Zeitkonstanten, was auf einen kinetischen Isotopeneffekt schließen lässt und unten detailliert betrachtet wird. Die für solubilisiertes PR in H₂O beim Wechsel des pD-Wertes berichtete Umkehr der Amplitudenverhältnisse der zerfallenssoziierten Spektren zu τ_2 und τ_3 [238] tritt auch hier auf: im sauren Bereich dominiert der langsamere Prozess, im basischen der schnellere.

Das auf langen Verzögerungszeiten konstante Signal wird mit $\tau_4 := \infty$ modelliert und entspricht dem PR_K–PR-Differenzspektrum. Auch hierauf wird später gesondert eingegangen.

IR Aufgrund der geringeren Zeitauflösung und zusätzlicher Störbeiträge um den Zeitnullpunkt lassen sich bei diesem Experiment keine Zerfallszeiten von $\tau < 0,2$ ps auflösen. Die globale Analyse ergibt, dass die Daten durch einer Summe aus vier Exponentialfunktionen optimal angepasst werden, die sich jedoch stark von den im sichtbaren Spektralbereich gefundenen Werten unterscheiden. Darüberhinaus wird in Messungen unter basischen Bedingungen derselbe Zeitverlauf wie unter sauren Bedingungen aufgezeichnet, was mit den nahezu identischen Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung bestätigt wird und dem Ergebnis der Messungen im vis-Bereich zu widersprechen scheint. Da die gleiche Probe wie bei der transienten Spektroskopie im sichtbaren Spektralbe-

reich benutzt wurde, können diese Unterschiede nicht auf die äußeren Bedingungen bzw. die Unterschiede in der Photoreaktion zurückgeführt werden. Diese scheinbare Diskrepanz lässt sich wie folgt erklären: die hier beobachteten hochfrequenten Schwingungsmoden reagieren empfindlich auf lokale Strukturänderungen, auf die Anregung gekoppelter niederfrequenter Moden infolge der IVR sowie auf Temperaturerhöhungen und Kühlprozesse in der Proteinumgebung. Während diese Effekte in den transienten vis-Spektren eine untergeordnete Rolle spielen, können sie die transienten IR-Spektren dominieren und Bandenform und -position maßgeblich beeinflussen. Daher ergeben sich nicht-exponentielle Zerfälle und die ermittelten Zeitkonstanten lassen sich nicht mehr direkt dem Populationstransfer zwischen spektral unterscheidbaren Zuständen zuordnen [62, 63].

Für den Bereich der C=C-Streckschwingung konnte festgestellt werden, dass nur die schnellste Komponente τ_1 mit der Photoproduktbildung assoziiert ist. Im Bereich von 1590 cm^{-1} bis 1680 cm^{-1} konnte dies wegen der kleineren Signale und des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht direkt verifiziert werden. Jedoch wurde auch hier beobachtet, dass der Aufbau des PR_K-PR-Spektrums im Spektralbereich der C=N-Mode innerhalb der ersten Pikosekunde erfolgt, ebenso wie im Amid I-Bereich des Proteinrückgrats. Diese direkte Reaktion der Proteinschwingungen werden auch in anderen Studien belegt: So wurde von Amsden *et al.* in einem vergleichbaren Experiment an rekonstituiertem PR in H₂O bei pH = 9,5 gezeigt, dass die Signale des Proteinrückgrats im Amid II-Bereich mit einer Zeitkonstante von 0,5 ps bis 0,7 ps gebildet werden [253].

Die DAS der Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 entsprechen dem transienten Spektrum der ausgebleichten C=C- und C=N-Banden unmittelbar nach der Anregung. Sie werden daher der biexponentiellen Wiederbesetzung der Schwingungen im Grundzustand des Retinals in PR zugeschrieben. Beide Prozesse tragen außerdem zur Bildung des negativen Signals im Amid I-Bereich bei 1660 cm^{-1} bei. Das DAS der Zeitkonstante τ_4 im IR entspricht wieder dem PR_K-PR-Spektrum und wird gesondert diskutiert.

Die im IR aufgezeichneten Prozesse werden offensichtlich nicht durch den pD-Wert der Lösung beeinflusst. Diese Feststellung ist unabhängig von der Zuordnung der ermittelten Zerfallskomponenten zu den molekularen Vorgängen. Die nach der Anregung auftretenden Kühlprozesse können die transienten IR-Spektren dominieren und diese Relaxationsprozesse sind weitgehend unabhängig vom pD-Wert. Damit ist die Beobachtung unterschiedlicher Zerfallskinetiken von sauren und alkalischen Proben im IR nicht zu erwarten: Etwaige pD-abhängige Unterschiede sind durch die Kühlprozesse überlagert und werden nicht mehr aufgelöst.

Außerdem sind die in dieser Studie beobachteten C=N- und C=C-Banden keine eindeutigen Indikatoren für die Isomerisierung des Retinals, z. B. ist die Lage der C=C-Bande stark von dem Grad der Delokalisierung der π -Elektronen abhängig, welche nicht mit der Isomerisierung verknüpft ist. Atkinson *et al.* untersuchten die Bildung der J-Intermediate von natürlichem BR und dem künstlichen BR_{5,12}. Dieses enthält ein modifiziertes Retinal, bei dem ein Fünfring über C₁₂-C₁₃=C₁₄ die Torsion um die C₁₃=C₁₄-Bindung und damit die Isomerisierung verhindert. Es zeigte sich, dass die spektralen Änderungen der C=C-Mode für BR und BR_{5,12} sehr ähnlich waren

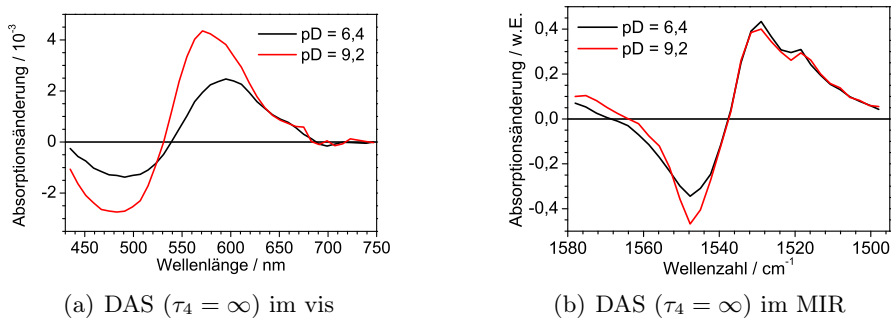


Abbildung 5.11: Vergleich der pH-Abhängigkeit der PR_K -PR-Differenzspektren im vis (a) und im MIR-Bereich (b). Wegen der Konzentrationsunterschiede der im IR eingesetzten Probenlösungen wurden diese Datensätze hinsichtlich der transienten Absorption am Zeitnullpunkt normiert.

[268]. Danach kann die Isomerisierung, also die Primärreaktion, nicht direkt anhand der C=C-Bande verfolgt werden, während die C-C-Bande bei 1200 cm^{-1} dieses ermöglicht.

Dessen ungeachtet haben Amsden *et al.* nachgewiesen, dass bei rekonstituiertem PR in H_2O bei $\text{pH} = 9,5$ die zeitliche Entwicklung bei der Bildung von PR_K im Bereich der C=C-Schwingungsbande mit der im C-C-Bereich bei 1200 cm^{-1} übereinstimmt. Für den sauren pH-Bereich liegen jedoch noch keine Daten vor, deshalb sollten die transienten Spektren im IR bei 1200 cm^{-1} für beide pH-Werte miteinander verglichen werden. Derartige Experimente sind in der Planung.

pH-Abhängigkeit der PR \rightarrow PR_K -Quantenausbeute

Der Vergleich der transienten Spektren zeigt, dass die im Sichtbaren beobachtete, ausgeprägte Abhängigkeit vom pD-Wert im Infraroten nicht auftritt. Dabei ist ein wichtiger Aspekt, dass die Absorptionsbande des Retinals im UV/vis-Absorptionsspektrum stark auf die Veränderung des pD-Wertes reagiert, was auch zu Unterschieden in den transienten Spektren führt [215, 222]. Mittels FTIR-Spektroskopie aufgenommene PR_K -PR-Differenzspektren zeigen dagegen in Zusammenhang mit dem Protonierungszustand von Asp97 nahezu keine Veränderungen im Bereich der C=N- und C=C-Bande [245, 249]. Das kann hier anhand der ausgebleichten Absorptionsbanden dieser Retinalschwingungen verifiziert werden, die nur eine geringe Verschiebung von etwa 3 cm^{-1} zwischen beiden Messungen aufweisen.

Da die Signale auf langen Verzögerungszeiten konstant sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Isomerisierungsreaktion abgeschlossen ist und das PR_K -PR-Differenzspektrum dem DAS zu τ_4 entspricht. Somit kann aus diesem Spektrum ebenfalls die Quantenausbeute der Reaktion $\text{PR} \rightarrow \text{PR}_K$ bestimmt werden. Diese Betrachtung ist unabhängig davon, ob die beobachteten Schwingungen direkt die Torsion um die $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ -Bindung abbilden. Normiert man die Datensätze hinsichtlich der prominenten Bleichsignale am Zeitnullpunkt, welche proportional zur Konzentration angeregter Moleküle sind, dann erhält man die in Abbildung 5.11 gezeigten DAS der Komponente $\tau_4 = \infty$.

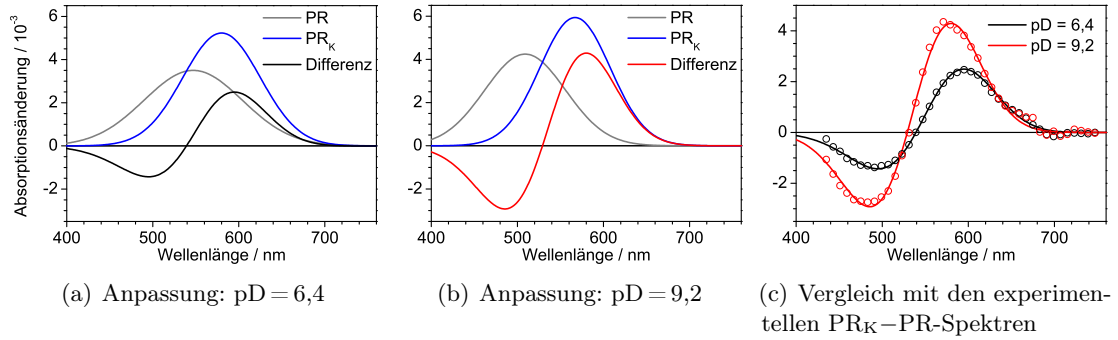


Abbildung 5.12: Analyse der PR_K–PR-Spektren für beide pD-Werte im vis. In Abb.(a) und (b) sind die nach Gleichung 5.1 angepassten Kurven sowie die mit diesen Parametern generierten Absorptionsspektren von PR und PR_K gezeigt. In (c) wird die gute Übereinstimmung der angepassten Funktionen mit den experimentell bestimmten Spektren deutlich.

Diese PR_K–PR-Differenzspektren beider pD-Werte zeigen nur geringe Abweichungen voneinander, während sich die im sichtbaren Spektralbereich stark in ihrer Amplitude unterscheiden.

Als Ursache lässt sich die pD-abhängige Verschiebung der Absorptionsbande im Sichtbaren vermuten, deren Bleichsignal die positive PR_K-Bande partiell überlagert und auslöscht. Um dies zu verifizieren wurden die im Sichtbaren ermittelten PR_K–PR-Differenzspektren beider Messungen als Summe aus zwei Gaußfunktionen modelliert:

$$\Delta A(\lambda) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \cdot \frac{A_1}{w_1} \cdot e^{-2\left(\frac{\lambda-\lambda_{c1}}{w_1}\right)^2} + \sqrt{\frac{2}{\pi}} \cdot \frac{A_2}{w_2} \cdot e^{-2\left(\frac{\lambda-\lambda_{c2}}{w_2}\right)^2} \quad (5.1)$$

Die Parameter für die Amplitude A , Zentralwellenlänge λ_c und Breite w der Funktionen wurden über einen Levenberg-Marquart-Algorithmus nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepasst. Dabei wurde der Parameter A_1 in beiden Fällen auf den Wert $A_1 = -0,5$ festgelegt, dieser repräsentiert die Fläche der ausgebleichten Grundzustandsbande. Identische Werte für A_1 entsprechen der Annahme einer identischen Entvölkerung des ursprünglichen Grundzustands und damit einer identischen Isomerisierungsquantenausbeute. Die verwendeten bzw. ermittelten Parameter werden in Tabelle 5.3 zusammengefasst und die resultierenden Kurven finden sich in Abbildung 5.12.

Obwohl mit der Verwendung von symmetrischen Gaußfunktionen eine relativ grobe Näherung zugrundegelegt wurde, ergeben sich für die PR_K–PR-Spektren beider pD-

pD-Wert	A_1	x_{c1}/nm	w_1/nm	A_2	x_{c2}/nm	w_2/nm
6,4	-0,5	547	114	0,59	580	90
9,2	-0,5	509	95	0,61	567	82

Tabelle 5.3: Parameter der Modellierung des PR_K–PR-Differenzspektrums im sichtbaren Spektralbereich gemäß Gleichung 5.1. Der Parameter A_1 wurde in beiden Fällen auf den Wert $-0,5$ festgelegt.

Werte konsistente und realistische Werte und eine hervorragende Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten PR_K –PR-Differenzspektren. Somit wurde gezeigt, dass die größeren Amplituden des Produktspektrums bei $\text{pD} = 9,2$ nicht zwingend auf eine größere Isomerisierungsquantenausbeute zurückzuführen sind, sondern allein mit der spektralen Verschiebung erklärt werden können. Die Spektren im IR sind nicht von derartig starken Verschiebungen betroffen und zeigen im sauren sowie alkalischen Bereich nahezu dasselbe PR_K –PR-Spektrum. Mit diesen neuen Informationen aus den Infrarotmessungen muss gefolgert werden, dass der Protonierungszustand von Asp97 keinen wesentlichen Einfluss auf die Isomerisierungsquantenausbeute des Retinals in PR hat.

Kinetischer Isotopeneffekt

Im Vergleich zu den Messungen an PR in H_2O im sichtbaren Spektralbereich [237, 238] ergibt die globale Analyse der Daten von PR in D_2O deutlich größere Werte für τ_2 und τ_3 (Tab. 5.2). Diese Verlangsamung der Reaktionskinetik ist durch den kinetischen Isotopeneffekt infolge des H/D-Austausches in der Umgebung des Retinals bedingt. Darüberhinaus sind die Unterschiede zwischen sauren und basischen Pufferbedingungen bei Messung in D_2O weitaus geringer als in H_2O , weil der Effekt offensichtlich vom pH- bzw. pD-Wert abhängt. Als kinetischer Isotopeneffekt einer Probe wird hier der Faktor angesehen, um den sich die Werte von τ_2 und τ_3 beim Übergang von H_2O auf D_2O im Mittel vergrößern. Im Sauren ergibt sich danach ein Isotopeneffekt von 1,6 und im Basischen $\approx 2,3$ – also ein wesentlich größerer Isotopeneffekt (vgl. Tab. 5.6, S. 137). Derzeit kann keine definitive Erklärung dieses Befundes gegeben werden, denn es ist noch keine Struktur von PR mit atomarer Auflösung bekannt, die den Rückschluss auf die beim Wechsel des pH-Wertes auftretenden Veränderungen in der Umgebung des Retinals erlaubt. FTIR-Untersuchungen konnten jedoch Wassercluster in der Retinalbindetasche von PR nachweisen und zeigen, dass das dort vorliegende Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk pH-abhängig ist [245, 246]. Insofern liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen dieser Wassercluster oder der Stärke der Wasserstoffbrücke zwischen ihnen und der protonierten Schiffischen Base die beobachtete pH-Abhängigkeit des Isotopeneffektes verursachen.

Es wird angenommen, dass die Reste Asp97 und Asp227 diese Wassercluster stabilisieren. Entsprechend können weitere Untersuchungen an modifiziertem PR wie PR-D97N oder PR.D227N weitere Informationen über die Struktur der Retinalbindetasche und den Einfluss auf die Photodynamik des Retinals liefern. Die Ergebnisse für PR-D97N liegen bereits vor und werden im nächsten Abschnitt vorgestellt. Die Messungen an PR.D227N werden derzeit innerhalb der Arbeitsgruppe von Julia Herz durchgeführt [232].

5.3 Untersuchung der Primärreaktion von PR-D97N

Die zeitaufgelösten Messungen am PR in H_2O und D_2O deuten darauf hin, dass die in der Retinalbindetasche vermuteten Wassercluster und das damit zusammenhängende pH-abhängige Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk die Primärreaktion stark beeinflussen.

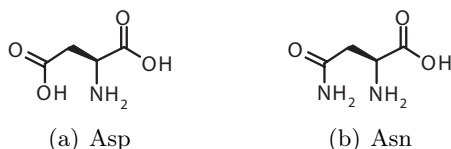


Abbildung 5.13: Strukturformeln der Asparaginsäure (Asp, Einbuchstabencode: *D*) und des Asparagins (Asn, Einbuchstabencode: *N*). Die übliche Bezeichnung Aspartat anstelle von Asparaginsäure gilt streng genommen nur für die deprotonierte Form, also das Säureanion.

Um diesen Aspekt zu erforschen und weitere Einblicke in die Kontrolle der Isomerisierungsreaktion zu erhalten wurde die Mutante PR-D97N in D₂O-Puffer untersucht.

Bei dieser spezifischen Mutation wird das als primärer Protonenakzeptor angenommene Aspartat (Asp97) durch ein Asparagin (Asn) ersetzt. Die beiden Aminosäuren unterscheiden sich nur durch eine funktionelle Gruppe in ihren Seitenketten (Abb. 5.13). Aspartat besitzt eine Carbonsäurefunktion, die in PR einen ungewöhnlich hohen pK_S-Wert von etwa 7,3 aufweist und deshalb im Alkalischen (pH > pK_S(Asp97)) deprotoniert und im Sauren (pH < pK_S(Asp97)) protoniert vorliegt. Die Seitenkette der neutralen Aminosäure Asparagin ist hingegen ein Säureamid, welches über einen weiten pH-Bereich nicht deprotoniert werden kann. Entsprechend kann PR-D97N als Modell für PR im sauren pH-Bereich angesehen werden, bei dem Asp97 protoniert und somit neutral vorliegt.

5.3.1 Probenpräparation

Auch die PR-D97N-Proben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Glaubitz von Ingrid Weber hergestellt. Die Expression in *Escherichia Coli* und die Aufreinigung folgte demselben Protokoll wie bei PR [242]. Weitere Details finden sich auch in [243, 269]. Die Messungen wurden in einer neutralen D₂O-Pufferlösung durchgeführt (500 mM NaCl, 0,1 % DDM, 20 mM TRIS pD = 7,4). Der Austausch der Pufferlösung des solubilisierten PR-D97N erfolgte wieder mit Centriprep Zentrifugalfiltern mit einer Durchlässigkeit von 10 kD (Millipore, Schwalbach).

5.3.2 UV/vis-Absorptionsspektrum

Abbildung 5.14 zeigt die UV/vis-Absorptionsspektren von PR-D97N in neutralen D₂O- und H₂O-Lösungen sowie von PR in saurer und alkalischer Pufferlösung. Das Maximum der Retinalabsorption in PR-D97N liegt bei etwa 550 nm und ist damit rotverschoben zu PR in saurer Umgebung. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den Spektren der Mutante in H₂O und D₂O sind vermutlich durch äußere Einflüsse wie unterschiedliche Präparation, Pufferbedingungen oder Salzgehalt bedingt.

Eine von Thomas Köhler durchgeführte pH-Titration von PR-D97N zeigt wie erwartet, dass die Absorptionsbande des Retinals über einen großen pH-Bereich unverändert bleibt [270]. Das unterstützt die allgemein akzeptierte Annahme, dass der Protonierungszustand

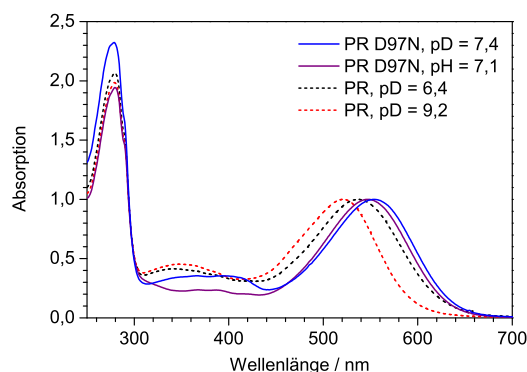


Abbildung 5.14: Absorptionsspektren von PR-D97N in D_2O und H_2O im Vergleich mit PR bei verschiedenen pD-Werten. Die Spektren wurden auf das Absorptionsmaximum des Retinals bei etwa 530 nm normiert und es wurde keine Streulichtkorrektur durchgeführt. Das in H_2O aufgenommene Spektrum wurde freundlicherweise von Thomas Köhler zur Verfügung gestellt [270].

von Asp97 für die bei PR beobachtete Verschiebung verantwortlich ist. Dementsprechend wurden hier nur Messungen in neutralem D_2O -Puffer (pD = 7,4) durchgeführt.

5.3.3 Transiente Absorptionsspektroskopie im MIR-Bereich

Messbedingungen

Der experimentelle Aufbau und die gewählten Messbedingungen entsprechen der Messung an Wildtyp-PR (Abschnitt 5.2.3, S. 110), sie werden daher nur kurz zusammengefasst. Die Messungen erfolgten im referenzierten Modus unter Einsatz der Rotationsküvette mit $50\ \mu\text{m}$ Schichtdicke und bei paralleler Polarisation von Anregungs- und Abtastlicht. Die Probenkonzentration wurde so eingestellt, dass sich im Absorptionsmaximum der Retinalbande ein Wert von etwa 0,5 ergab. Um die direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen an PR zu gewähren, wurde die PR-D97N-Probe ebenfalls bei 525 nm angeregt, die Pulsenergie betrug 150 nJ. Der abgetastete Spektralbereich und die Abtastzeitpunkte wurden entsprechend der Messung am Wildtyp gewählt.

Ergebnisse der Messungen

Wie in den 2d-Grafiken in Abbildung 5.15 gut zu erkennen ist, entsprechen die transienten Absorptionsspektren der PR-D97N -Probe weitgehend denen des Wildtyp-PR (vgl. Abb. 5.4, S. 111). Die Interpretation der auftretenden Effekte und die Zuordnung der Probensignale zu den Schwingungsmoden des Retinals bzw. des Proteins erfolgt analog und wird deshalb nur zusammengefasst dargestellt. Für weitere Details sei auf Abschnitt 5.2.3 ab Seite 111 hingewiesen.

Unmittelbar mit der Anregung entstehen die folgenden dominanten Differenzsignale: $1530\ \text{cm}^{-1}(-)$: ausgebleichte C=C-Streckschwingung des Retinals, $1510\ \text{cm}^{-1}(+)$:

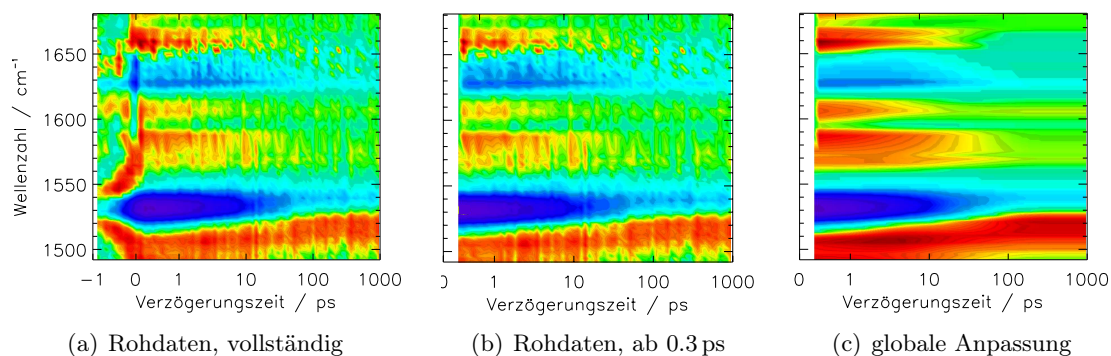


Abbildung 5.15: Transiente Absorptionsänderung von PR-D97N nach Anregung bei 525 nm bestehend aus zwei Einzelmessungen. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. In (a) ist die PFID-Signatur vor dem Zeitnullpunkt sowie die um den Zeitnullpunkt dominierende Kreuzphasenmodulation deutlich zu erkennen. In (b) wird nur der Zeitbereich ab 0,3 ps dargestellt, was zu einer etwas besseren Farbskala führt. Im Zeitbereich von 0,3 ps bis 1,8 ns wurde eine globale Analyse durchgeführt. Das Ergebnis der globalen Anpassung mit 4 exponentiellen Zerfallsfunktionen wird in (c) dargestellt.

C=C-Streckschwingung angeregter Retinale, 1629 cm^{-1} (–): ausgebleichte C=N-Streckschwingung der Schiffischen Base. Nach etwa 50 ps ist bei 1660 cm^{-1} wieder die Ausbildung einer negativen Bande zu erkennen, was die Reaktion der Amid I-Mode des Proteinrückgrats auf die Anregung des Retinals widerspiegelt. Die Differenzsignale sind bei langen Verzögerungszeiten konstant und ähneln den mit anderen Methoden gewonnenen Differenzspektren des K-Intermediates: PR_K–PR der D97N-Mutante [246, 249].

Mit einer Wellenzahl von 1530 cm^{-1} ist die C=C-Streckschwingungsmode bei PR-D97N verglichen mit PR bei pD = 9,2 (1542 cm^{-1}) oder pD = 6,4 (1540 cm^{-1}) deutlich rotverschoben. Das ist nach der linearen Beziehung zwischen dem vis-Absorptionsmaximum des Retinals und der Wellenzahl der C=C-Mode erwartungsgemäß (vgl. S. 113)

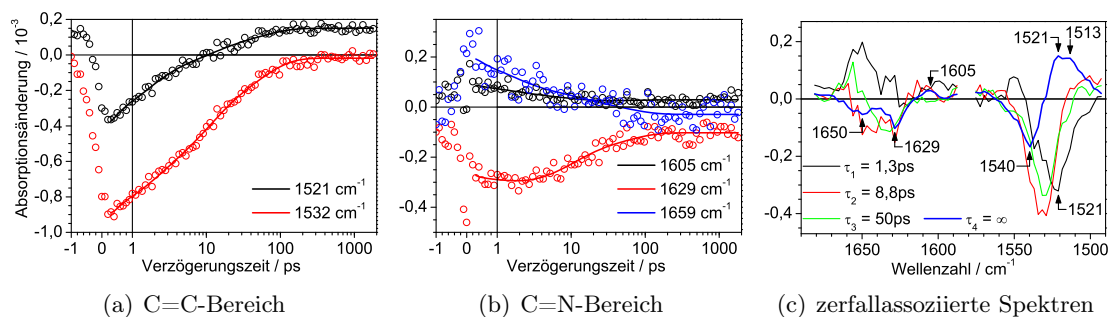


Abbildung 5.16: Transienten ausgewählter Wellenzahlen und zerfallenssoziierte Spektren der globalen Analyse mit vier Zeitkonstanten von PR-D97N. Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung als Linien dargestellt.

[247, 248], da auch die Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich rotverschoben zu der des Wildtyps ist. Auf der Zeitskala von einigen zehn Pikosekunden geht das ursprüngliche Bleichsignal um etwa 80 % zurück, dabei schiebt das Minimum um 10 cm^{-1} auf 1540 cm^{-1} . Die Wellenzahl der positiven Bande der C=C-Mode schiebt ebenfalls deutlich von 1508 cm^{-1} auf 1521 cm^{-1} bei gleichzeitiger Veränderung der Bandenform, während der Wert der Absorptionsänderung im Maximum in etwa konstant bleibt. Die gut aufgelösten Signaländerungen auf dem Maximum der Produktabsorption (1521 cm^{-1}) sowie dem Minimum der ausgebleichten Grundzustandsbande (1530 cm^{-1}) werden in Abbildung 5.16(a) dargestellt.

Der Messbereich von 1590 cm^{-1} bis 1680 cm^{-1} weist leider ein deutlich schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, was in der höheren Proteinabsorption in diesem Bereich sowie ungünstigeren experimentellen Bedingungen in dieser Messung begründet ist. Daher ist die Auswertung in diesem Spektralbereich mit größerer Unsicherheit behaftet, wie man gut an den Transienten der im Folgenden genannten Differenzbanden nachvollziehen kann (Abb. 5.16(b)). Das Bleichsignal der C=N-Streckschwingung bei 1629 cm^{-1} geht innerhalb von 100 ps auf etwa 1/3 des ursprünglichen Wertes zurück, dabei bleibt die Bandenform und -lage erhalten. Das positive Signal bei 1605 cm^{-1} ist vermutlich der C=N-Schwingung angeregter Moleküle zuzuordnen und zeigt einen vergleichbaren Rückgang der Amplitude ohne erkennbare Änderungen der Bandenform. Eine genauere Aussage lässt sich wegen der sehr kleinen, gerade noch aufgelösten Absorptionsänderung nicht treffen. Bei 1660 cm^{-1} tritt unmittelbar nach der Anregung eine positive Absorptionsänderung auf, welche zerfällt und nach etwa 50 ps in eine negative Bande übergeht. Dieses verzögert auftretende Bleichsignal wird der Amid I-Mode des Proteinrückgrats zugeschrieben.

Globale Analyse

Der Datensatz wurde für $t > 0,3\text{ ps}$ mit unterschiedlich vielen Zerfallskomponenten global analysiert. Wie bei den Wildtyp-PR-Daten wurde mit der Anpassung einer Summe aus vier Exponentialfunktionen, von denen eine auf den Wert ∞ festgelegt wurde, die optimale Modellierung der Daten erreicht. Die damit ermittelten Zeitkonstanten sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst und den Werten vom Wildtyp-PR bei pD = 6,4 und pD = 9,2 gegenübergestellt. Außer einem deutlich größeren Wert von τ_1 bei PR-D97N stimmen die Zeitkonstanten im Rahmen der Analysegenauigkeit für alle Messungen an PR und PR-D97N überein. Dasselbe gilt für die zerfallassozierten Spektren. Diese gleichen bei PR-D97N weitgehend denen der globalen Analyse von PR, bis auf die bereits erwähnte stärkere Verschiebung der C=C-Bande. Somit können die bei PR in Abschnitt 5.2.3 (ab S. 114) gemachten Ausführungen für die Interpretation herangezogen werden. Diese werden hier zusammengefasst.

Die bei langen Verzögerungszeiten praktisch konstanten Differenzsignale werden durch die Komponente τ_4 modelliert und entsprechen dem Differenzspektrum zwischen dem K-Intermediat und dem Spektrum vor der Anregung von PR-D97N. In Anbetracht der unterschiedlichen Messmethoden und Probenbedingungen stimmt es gut mit den entsprechenden Tieftemperatur-FTIR-Spektren überein [246, 249]. Die auftretenden Signale

Probe	τ_1/ps	τ_2/ps	τ_3/ps	τ_4
PR-D97N, D ₂ O, pD = 7,4	1,3	9	50	∞
PR, D ₂ O, pD = 6,4	0,5	6	46	∞
PR, D ₂ O, pD = 9,2	0,6	7	66	∞

Tabelle 5.4: Zeitkonstanten aus der globalen Analyse der transienten IR-Spektren von PR-D97N im Vergleich mit den entsprechenden Werten des Wildtyp-PR in saurer und basischer Pufferlösung.

können den zuvor beschriebenen Banden zugeordnet werden: C=C-Mode: 1521 cm^{-1} (+) und 1540 cm^{-1} (-), C=N-Mode: 1605 cm^{-1} (+) und 1629 cm^{-1} (-), Amid I-Mode des Proteinrückgrats: 1650 cm^{-1} (-).

Anhand ihrer DAS können die Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 im Bereich der C=C- und der C=N-Mode nicht mit der Bildung der Produktbanden in Verbindung gebracht werden. Ihre spektrale Signatur wird durch negative Banden bei 1630 cm^{-1} und 1529 cm^{-1} dominiert und ähnelt den Bleichbanden am Zeitnullpunkt. Folglich tragen beide Komponenten wesentlich zu einem Rückgang der instantanen Bleichsignale bei, also zu einer Wiederbesetzung der ursprünglich ausgebleichten Zustände. Es ist anzunehmen, dass beide Zerfallszeiten einen Kühlprozess modellieren, der sowohl in isomerisierten 13-*cis* als auch nicht isomerisierten all-*trans* Retinalen nach dem Übergang vom elektronisch angeregten in den Grundzustand stattfindet. Im Bereich der Amid I-Mode kann festgestellt werden, dass die Komponenten τ_2 und τ_3 bei 1660 cm^{-1} positive Amplituden aufweisen und damit ebenfalls zur Bildung des negativen Amid I-Signals beitragen. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen beim Wildtyp-PR, ist jedoch wegen des starken Rauschens in diesem Spektralbereich mit größerer Unsicherheit behaftet.

Das zerfallenssoziierte Spektrum der kürzesten Zeitkonstante τ_1 unterscheidet sich in der spektralen Signatur deutlich von den drei übrigen. Das Minimum bei 1521 cm^{-1} ist identisch mit dem Maximum der Produktabsorption (DAS zu $\tau_4 := \infty$). Außerdem besitzt es als einziges positive Amplituden zwischen 1560 cm^{-1} und 1542 cm^{-1} , die mit zur Bildung negativer Produktsignale in diesen Bereichen beitragen. Deswegen wird der Prozess zu τ_1 der Produktbildung, also der Isomerisierung des Retinals, zugeschrieben. Im Bereich zwischen 1590 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} gilt in Bezug auf die negativen Amid I und C=N-Streckschwingungssignale des Produktes dieselbe Argumentation, nicht aber für die positive Produktbande bei 1605 cm^{-1} . Aufgrund des starken Rauschens in dieser Messung ergibt sich gerade für die Anpassung der kürzesten Zeitkonstante eine große Unsicherheit. Deshalb ist eine genauere Analyse in Bezug auf das sehr kleine Differenzsignal bei 1605 cm^{-1} nicht möglich.

5.3.4 Transiente Absorptionsspektroskopie im vis-Bereich

Messbedingungen

Die Messungen der transienten Absorption im sichtbaren Spektrum von PR-D97N in D₂O-Pufferlösung wurde zusammen mit den Experimenten am Wildtyp-PR von Mirka-

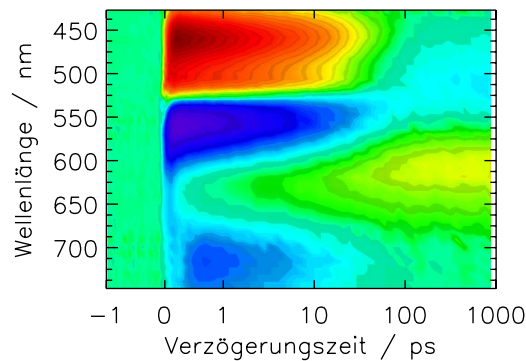


Abbildung 5.17: Transiente Absorptionsänderung im vis-Bereich von PR-D97N nach Anregung bei 525 nm. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten.

Kristin Verhoefen durchgeführt. Um die direkte Vergleichbarkeit der Datensätze für alle Proben zu gewährleisten sollten alle unter identischen experimentellen Bedingungen gemessen werden. Deshalb wurde der optische Aufbau zwischen den Messungen der verschiedenen Proben nicht verändert oder nachjustiert und dementsprechend wurde die PR-D97N-Probe nicht im Absorptionsmaximum der Retinalbande angeregt, sondern in der Flanke bei 525 nm. Die Präparation der Probe erfolgte wie bereits in Abschnitt 5.3.1 auf Seite 128 beschrieben, die Absorption der Probe in der Messzelle wurde auf einen Wert von 0,5 bei der Anregungswellenlänge eingestellt. Alle weiteren experimentellen Details können Abschnitt 5.2.4 ab Seite 118 entnommen werden.

Ergebnisse der Messungen

Die 2d-Darstellung der transienten Absorptionsänderungen von PR-D97N in D₂O (Abb. 5.17) zeigt, dass dieselben charakteristischen Signale wie beim Wildtyp-PR auftreten (vgl. Abb. 5.8, S. 119). Die unmittelbar am Zeitnullpunkt auftretenden dominanten Signale sind dem Übergang in den elektronisch angeregten Zustands zuzuordnen, sie zerfallen innerhalb von ca. 100 ps. Das Bleichsignal des Grundzustands liegt zwischen 530 nm und 610 nm. Auf der blauen Flanke wird es teilweise von der Absorption des angeregten Zustands überlagert, die zwischen 430 nm und 520 nm als positives Signal zu erkennen ist. Das Bleichsignal oberhalb von 650 nm wird durch die stimulierte Absorption verursacht. Sie zeigt – wie beim PR – ein im Vergleich zur Absorption des angeregten Zustands und dem Grundzustandsbleichen verzögertes Erreichen der maximalen Amplitude. All diese Signale zeigen die gleiche Zerfallskinetik, wie sich anhand der Transienten nachvollziehen lässt (Abb. 5.18).

Bei langen Verzögerungszeiten wird das konstante PR_K–PR-Spektrum der Mutante mit einem Maximum bei 618 nm und einem Minimum bei 509 nm beobachtet. Der spektrale Überlapp zwischen der positiven Produktbande und der ausgebleichten Grundzustandsbande ist bei PR-D97N größer als bei PR. Aufgrund der Überlagerung beider Beiträge erscheint die Entstehung der Produktbande hier stark verlangsamt.

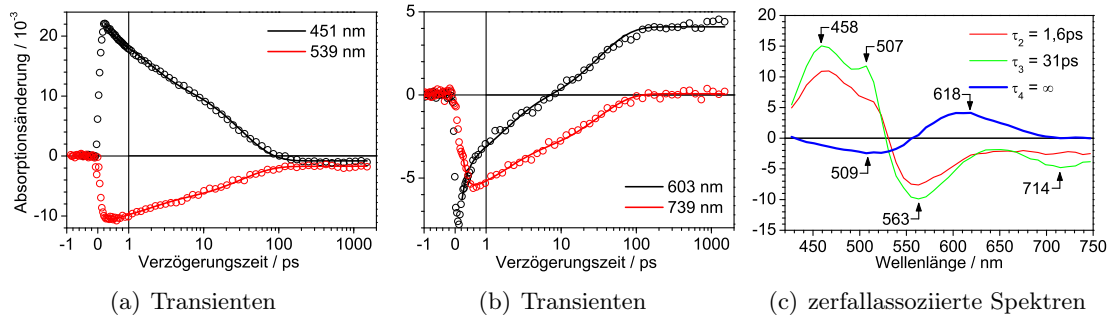


Abbildung 5.18: Transienten ausgewählter Wellenlängen und zerfallassozierte Spektren der globalen Analyse mit vier Zeitkonstanten von PR-D97N. Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung als Linien dargestellt. Das Spektrum der kürzesten Zeitkonstanten $\tau_1 \leq 0,2$ ps wird nicht gezeigt.

Globale Analyse

Die globale Analyse des Datensatzes für $t \geq 0,15$ ps ergab eine optimale Beschreibung der Daten durch eine Summe aus vier Exponentialfunktionen, wobei eine Zeitkonstante auf den Wert ∞ festgelegt wurde. Die ermittelten Zeitkonstanten sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst, sie ähneln den für PR in D_2O bei $pD = 6,4$ bzw. den für PR-D97N in H_2O ermittelten Werten [269]. Erwartungsgemäß lassen sich die DAS (Abb. 5.18(c)) analog zu denen der PR-Datensätze interpretieren (vgl. Abschnitt 5.2.4, S. 120):

Die kürzeste Zeitkonstante τ_1 liegt im Bereich der Zeitauflösung, auf die Darstellung und Zuordnung ihres zerfallassozierten Spektrums wird daher verzichtet. Zur Anpassung der Kurven an die Daten wird sie dennoch benötigt, da beispielsweise der verzögerte Anstieg der stimulierten Emission mit dieser Komponente beschrieben wird.

Die DAS der Komponenten τ_2 und τ_3 zeigen beide den Rückgang der kurz nach dem Zeitnullpunkt dominierenden Beiträge aus Absorption des angeregten Zustands, Grundzustandsbleichen und stimulierter Emission. Folglich stellen sie die biexponentielle Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands dar, wobei hier die langsamere Komponente die größere Amplitude besitzt.

Probe	τ_1 /ps	τ_2 /ps	τ_3 /ps	τ_4
PR-D97N, D_2O , $pD = 7,4$	$< 0,2$	1,6	31	∞
PR-D97N, H_2O , $pH = 7,5$	$< 0,2$	1,4	20	∞
PR, D_2O , $pD = 6,4$	$< 0,15$	1,6	25	∞
PR, D_2O , $pD = 9,2$	$< 0,15$	0,7	21	∞

Tabelle 5.5: Vergleich Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung der transienten vis-Spektren von PR-D97N in D_2O und H_2O mit denen des Wildtyp-PR in D_2O . Die Daten für H_2O wurden der Literatur entnommen [269]

Mit $\tau_4 = \infty$ wird wieder das konstante Signal bei langen Verzögerungszeiten angepasst, das zerfallassozierte Spektrum entspricht somit dem PR_K –PR-Differenzspektrum von PR-D97N. Der spektrale Überlapp der Retinalabsorption im all-*trans*-Grundzustand mit der Absorptionsbande des isomerisierten 13-*cis*-Retinals im K-Intermediat führt beinahe zur Auslöschung beider Signale mit entsprechend geringen Differenzamplituden.

5.3.5 Diskussion

Die an PR-D97N durchgeführten Studien stellen eine Erweiterung der bisher vorgestellten Messungen zur Aufklärung der Primärdynamik von Proteorhodopsin dar. Die ersten Kurzzeitmessungen wurden an der solubilisierten PR-D97N-Probe in H_2O durchgeführt. Diese bestätigten bereits die Annahme, dass die Primärreaktion bei dieser Mutante und bei PR mit protonierten Asp97 große Gemeinsamkeiten zeigen [269]. Weder die transienten Spektren im infraroten noch die im sichtbaren Spektralbereich geben Hinweise auf grundlegende Unterschiede zum Wildtyp. Daher können diese Messungen im Rahmen des für PR entwickelten Reaktionsmodells interpretiert und mit den bekannten Daten verglichen werden.

Kinetische Parameter

vis Die in der globalen Analyse ermittelten Komponenten gleichen denen von solubiliertem PR-D97N in H_2O [269] und sie werden analog zu denen der Wildtyp-PR-Proben interpretiert:

Direkt nach der Photoanregung relaxiert die S_1 -Population und das Wellenpaket bewegt sich aus der Franck-Condon-Region. Dieser sehr schnelle Prozess wird durch die Komponente τ_1 beschrieben. Die Zerfallszeit ist jedoch im Bereich der Zeitauflösung des Experiments, daher können auf Grundlage der vorliegenden Daten keine weitergehenden Aussagen gemacht werden.

Die zerfallassozierten Spektren zu τ_2 und τ_3 sind einander sehr ähnlich. Beide Prozesse modellieren die biexponentielle Depopulation des elektronisch angeregten Zustands über die auf der S_1 -Potentialfläche verzweigten Reaktionskanäle. Beide Deaktivierungspfade durchlaufen dieselbe konische Durchschneidung und populieren den elektronischen Grundzustand des Retinals sowohl in der isomerisierten 13-*cis*- (K-Intermediat) als auch in der ursprünglichen all-*trans*-Konfiguration. Die Amplituden des DAS der langsameren Komponente τ_3 sind hier größer als die der schnelleren τ_2 , was auf die Bevorzugung des langsameren Zerfallskanals hindeutet. Das ist auch bei PR im sauren pH- bzw. pD-Bereich, also bei protoniertem und daher neutralem Asp97 der Fall – wo im übrigen nahezu dieselben Zerfallszeiten auftreten (Tab. 5.5). Die globale Analyse der Daten von PR-D97N in H_2O lieferte ebenfalls ähnliche Zeitkonstanten und DAS wie die hier präsentierte Messung in D_2O , nur ist das Amplitudenverhältnis der DAS von τ_2 zu τ_3 gerade umgekehrt. Leider kann nicht geklärt werden, ob es sich tatsächlich um eine systematische Abweichung aufgrund des H/D-Austausches handelt, oder ob geringfügige

experimentelle Unterschiede z. B. in der Probenpräparation oder Anregungswellenlänge dafür verantwortlich sind.

Nach dem Abklingen aller Signale, die dem elektronisch angeregten Zustand zuzurechnen sind, bleibt das PR_K -PR-Differenzspektrum als konstante Absorptionsänderung bestehen. Es wird durch die Komponente $\tau_4 = \infty$ angepasst. Eine Aussage zur Quantenausbeute der Isomerisierung ist hier nicht möglich, weil die geringe Amplitude des DAS zu τ_4 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine höhere Auslöschung von positiver PR_K - und negativer PR-Bande in Folge des großen spektralen Überlapps zurückzuführen ist. Bandenform und -position beider Anteile können jedoch nicht unabhängig voneinander exakt bestimmt werden.

IR Die Analyse der transienten Infrarotspektren von PR-D97N liefert im Wesentlichen dieselben Ergebnisse wie sie für PR schon erläutert wurden. Danach sind die Prozesse zu τ_2 und τ_3 nicht mit der Produktbildung, also der Isomerisierung assoziiert, sondern mit der Wiederbesetzung ausgebleichter Grundzustandsschwingungsbanden. Die Werte dieser Zerfallszeiten sind für alle untersuchten Proben im Rahmen der Genauigkeit der globalen Analyse identisch (vgl. Tab. 5.4, S. 132). Das erlaubt den Schluss, dass der zugrundeliegende Prozess weder durch den Protonierungszustand von Asp97 beim PR noch durch die bei PR-D97N eingeführte Mutation in der Retinalbindetasche beeinflusst wird. Die zuvor für PR vorgenommene Zuordnung der Komponenten τ_2 und τ_3 zu Kühlprozessen (vgl. Abschnitt 5.2.5, ab S. 122) wird durch die Messung der PR-D97N-Probe unterstützt und entsprechend übernommen.

Signaturen, die den Aufbau des auf langen Zeiten konstanten PR_K -PR-Spektrums der Mutante modellieren, lassen sich nur im DAS der Komponente τ_1 identifizieren. Auffällig ist, dass dieser Wert bei PR-D97N ($\tau_1 = 1,3$ ps) mehr als doppelt so groß ist, wie die bei PR im Sauren ($\tau_1 = 0,5$ ps) oder im Basischen ($\tau_1 = 0,6$ ps) ermittelten Zeitkonstanten. Das weist auf eine signifikante Verlangsamung der Isomerisierungsreaktion infolge der Mutation hin, während der Protonierungszustand von Asp97 bei PR keinen derartigen Einfluss zeigt. Daraus ist zu schließen, dass die Kontrolle der Reaktionskinetik nicht nur durch elektrostatische Wechselwirkungen innerhalb der Retinalbindetasche erfolgt. Es ist anzunehmen, dass sehr viel komplexere Mechanismen eine Rolle spielen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Produktbildung sehr schnell erfolgt und bereits innerhalb der Kreuzkorrelationszeit abgeschlossen ist. Darüberhinaus könnten die experimentellen Bedingungen für eine Veränderung der initialen Reaktionskinetik mitverantwortlich sein: PR-D97N wurde nicht im Absorptionsmaximum sondern in der kurzwelligen Flanke der Retinalbande angeregt, so dass höher schwingungsangeregte Zustände in der Franck-Condon-Region populiert wurden. Die höhere Überschussenergie könnte mit der Bevorzugung anderer Reaktionspade im S_1 verbunden sein.

Das DAS zu $\tau_4 = \infty$ entspricht – angesichts der unterschiedlichen Probenpräparationen und Messbedingungen – den publizierten PR_K -PR-Differenzspektren von PR-D97N aus Tieftemperatur-FTIR-Messungen. Aufgrund der im Vergleich zu PR stärker zu niedrigeren Wellenzahlen verschobenen Bande der C=C-Mode des Retinals im all-*trans*-Grundzu-

stand ist die Amplitude in diesem Bereich deutlich verringert. Insofern lässt sich auch aus den Photoproduktspektren im infraroten Spektralbereich keine Quantenausbeute für die Isomerisierung angeben.

Kinetischer Isotopeneffekt

Die im sichtbaren Spektralbereich ermittelten Zerfallszeiten τ_2 und τ_3 entsprechen der Deaktivierung des elektronisch angeregten Zustands über einen verzweigten Reaktionspfad. Wegen des kinetischen Isotopeneffekts wurden bei allen untersuchten Proben in H_2O -Puffern deutlich kleinere Zeitkonstanten ermittelt, als in D_2O -Puffern. Offensichtlich kann nur ein H/D-Austausch im Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk der unmittelbaren Retinalumgebung die Deaktivierung des angeregten Zustands derartig stark beeinflussen. So ergaben FTIR-Studien bereits Hinweise auf interne Wassermoleküle, die über Wasserstoffbrücken mit der protonierten Schiffischen Base und den Seitengruppen von Asp97 und Asp227 verbunden sind [245, 246].

Die relevanten Zerfallszeiten aller untersuchten Proben und die daraus errechneten Faktoren sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst, die Unterschiede zwischen den Proben sind deutlich erkennbar. Dieser Befund legt folgende Erklärung nahe: Unter alkalischen Bedingungen (Asp97 deprotoniert) katalysiert das Wassercluster bei PR die schnelle Deaktivierung des angeregten Zustands. Der H/D-Austausch bewirkt in dem Fall eine starke Verlangsamung der Reaktion, also einen großen Effekt. Ist Asp97 bei PR im sauren pH-Bereich protoniert oder bei PR-D97N durch ein Asparagin ersetzt, dann liegt kein äquivalenter Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor vor, das Wassercluster ist gestört und der katalytische Effekt herabgesetzt. Der H/D-Austausch hat in diesem gestörten Netzwerk nur noch wenig Einfluss, der beobachtete kinetische Isotopeneffekt ist geringer.

Strukturelle Untersuchungen mittels ^{15}N -Kernspinresonanzspektroskopie unterstützen diese Thesen: Eine Veränderung der chemischen Verschiebung der Schiffischen Base bei PR-D97N im Vergleich zu PR belegt die abgeschwächte Wechselwirkung der Schiffischen Base mit der Umgebung im Fall der Mutante [240].

Auch für das archaeale Retinalprotein BR wurde die Existenz einer starken Wasserstoffbrückenbindung zwischen der protonierten Schiffischen Base und einem internen

Probe	D_2O		H_2O		$\langle \text{KIE} \rangle$
	τ_2/ps	τ_3/ps	τ_2/ps	τ_3/ps	
PR, basisch	0,7	21	0,28	9,5	$\approx 2,3$
PR, sauer	1,6	25	1	16,2	$\approx 1,6$
PR-D97N	1,6	31	1,4	20	$\approx 1,3$

Tabelle 5.6: Kinetische Isotopeneffekte (KIE) der in dieser Arbeit untersuchten PR-Proben. Für die Berechnung des KIE wurden für jede der Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 jeweils der Quotient der in D_2O und H_2O ermittelten Werte gebildet und danach gemittelt. Die Werte der Messungen in H_2O wurden der Literatur entnommen [238, 269].

Wassermolekül (W402) im extrazellulären Halbkanal nachgewiesen. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass das Zusammenspiel der bei BR am Protonentransport beteiligten, stark gebundenen Wassermoleküle bei der BR.D85N-Mutante, dem Analogon zu PR-D97N, stark gestört war [271].

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Primärreaktion von PR in saurer und alkalischer sowie von PR-D97N in neutraler D₂O-Pufferlösung mittels transientser Spektroskopie im sichtbaren und infraroten Spektralbereich untersucht.

Die im infraroten Spektrum auftretenden Veränderungen können den C=C- und C=N-Schwingungsmoden des angeregten Retinals und der Amid I-Mode des Proteins zugeordnet werden. Die durchgeführte globale Analyse ergibt vier Zerfallskomponenten, die der Photoproduktbildung, molekularen Kühlprozessen und dem PR_K-PR-Spektrum zuzuordnen sind. Die ermittelten Zerfallszeiten sind für alle Proben weitgehend identisch, nur die Produktbildung (τ_1) scheint bei PR-D97N deutlich verlangsamt zu sein. Mit Hilfe der PR_K-PR-Differenzspektren von PR im Sauren und Alkalischen konnte die Isomerisierungsquantenausbeute in beiden Proben verglichen werden: Im Rahmen der Messgenauigkeit ist sie in beiden Fällen gleich. Die in transienten vis-Spektren ermittelten Unterschiede in den Amplituden der PR_K-PR-Differenzspektren werden mit der pH-abhängigen Verschiebung der Absorptionsbande des Retinals erklärt und stehen somit nicht im Widerspruch zu den neuen Erkenntnissen.

Die im sichtbaren Spektralbereich aufgenommenen transienten Spektren von PR bzw. PR-D97N in D₂O zeigen dieselben Merkmale wie die zuvor in H₂O-Puffer aufgenommenen. Die globale Analyse ergibt wieder vier Komponenten: Wellenpaketsbewegung aus der Franck-Condon-Region, biexponentieller Zerfall des elektronisch angeregten Zustands und das auf langen Zeiten konstante PR_K-PR-Differenzspektrum. Die ermittelten Zeitkonstanten stimmen nicht mit denen der IR-Messungen überein. Insbesondere zeigen sich bei der Analyse der Kinetik der drei gemessenen Proben deutliche Unterschiede, was im IR nicht der Fall ist. In den beiden Spektralbereichen werden dementsprechend komplementäre Informationen des Reaktionsverlaufes abgebildet.

Verglichen mit den vis-Messungen von PR und PR-D97N in H₂O sind die Lebensdauern des angeregten Zustands (τ_2 und τ_3) bei D₂O deutlich verlängert. Das stellt einen kinetischen Isotopeneffekt infolge des H/D-Austausches in der Retinalbindetasche dar, der allerdings für die einzelnen Proben unterschiedlich stark ausfällt. Dieser pH-abhängige Isotopeneffekt wird mit dem Einfluss eines Wasserclusters in der Retinalumgebung erklärt, das über eine Wasserstoffbrücke direkt mit der protonierten Schiffischen Base wechselwirkt und bei protoniertem Asp97 und in PR-D97N gestört ist.

Insgesamt kann aus den Daten geschlossen werden, dass die Primärreaktion von PR äußerst komplex ist und nicht nur durch die Elektrostatik sondern auch durch das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk innerhalb der Retinalbindetasche bestimmt wird. Da das angenommene Wassercluster neben Asp97 auch durch Asp227 stabilisiert

wird, sollten Untersuchungen der PR D227N-Mutante weitergehende Einblicke in diesen Mechanismus gestatten. Diese Messungen werden zur Zeit von Julia Herz im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt und die ersten Ergebnisse weisen auf einen geringen kinetischen Isotopeneffekt wie bei PR-D97N hin und stützen so das entwickelte Modell [232]. Gleichzeitig sind die ermittelten Lebensdauern des angeregten Zustands jedoch noch kürzer als bei PR im basischen und zeigen keine signifikante pH-Abhängigkeit. Zur Erklärung aller inzwischen vorliegenden Messdaten werden daher weitere Verfeinerungen des vorgeschlagenen Mechanismus der Reaktionskontrolle erforderlich sein.

Im infraroten Spektralbereich sollten weitere Messungen durchgeführt werden, bei denen der Bereich der C–C-Mode um 1200 cm^{-1} abgefragt wird. Hier kann eindeutig die Isomerisierung abgebildet werden, während die bisher betrachteten C=C- und C=N-Moden nur indirekt an diese Torsionskoordinate koppeln. Darüberhinaus könnten polarisationsabhängige transiente Spektren und die daraus ermittelten Anisotropieparameter noch weitere strukturelle Informationen liefern, wie es in dieser Arbeit für ein artifizielles System demonstriert wird (vgl. Abschnitt 6.5.3, ab S. 186). Seit den ersten Messungen an PR wurde die Infrarotmessapparatur wesentlich verbessert, so dass die für diese Experimente erforderliche Stabilität und Sensitivität inzwischen routinemäßig erreicht wird – wie aktuelle Experimente beweisen.

Trotzdem wird die Analyse der transienten IR-Spektren bei PR stets durch den vergleichsweise langsamen biexponentiellen Zerfall des elektronisch angeregten Zustands erschwert werden. So überlagern zum einen die Schwingungsmoden des S_1 -Zustands mit denen von *all-trans*- und *13-cis*-Retinalen im Grundzustand und zum anderen werden durch den Zerfall des S_1 -Zustands laufend schwingungsheiße Retinale beider Konfigurationen im Grundzustand erzeugt. Wie eine Messung ohne derartige Komplikationen aussehen könnte, soll im Folgenden am Beispiel einer Messserie von ChR-2⁴ demonstriert werden.

Transiente IR Spektroskopie an ChR-2 Hier werden aktuelle Messungen am eukaryotischen Retinalproteins ChR-2 präsentiert, diese werden aufgrund des bisherigen Umfangs dieser Arbeit jedoch nicht mehr im Detail diskutiert. Die Experimente wurden gemeinsam mit Mirka-Kristin Verhoefen durchgeführt, für weitere Informationen sei daher auf ihre Dissertation verwiesen [258].

Die transienten Infrarotspektren wurden in drei benachbarten Spektralbereichen nach Anregung im magischen Winkel bei 430 nm mit einer Pulsenergie von 400 nJ bei 50 μm Schichtdicke gemessen. Aufgrund der geringen Probenmenge betrug die Absorption bei 450 nm nur 0,15, dementsprechend sind die durch die Probendynamik verursachten Differenzsignale sehr klein ($\Delta A < 0,2 \times 10^{-3}$) während das XPM-Signal am Zeitnullpunkt etwa die doppelte Amplitude aufweist.

Trotz der kleinen Signale erkennt man unmittelbar nach dem Abklingen der kohärenten Effekte eine Vielzahl von Differenzbanden (Abb. 5.19), deren Zeitverhalten sich deutlich von dem der PR-Proben unterscheidet. Dieser Unterschied liegt in der extrem kurzen

⁴ChR-2: Channelrhodopsin-2

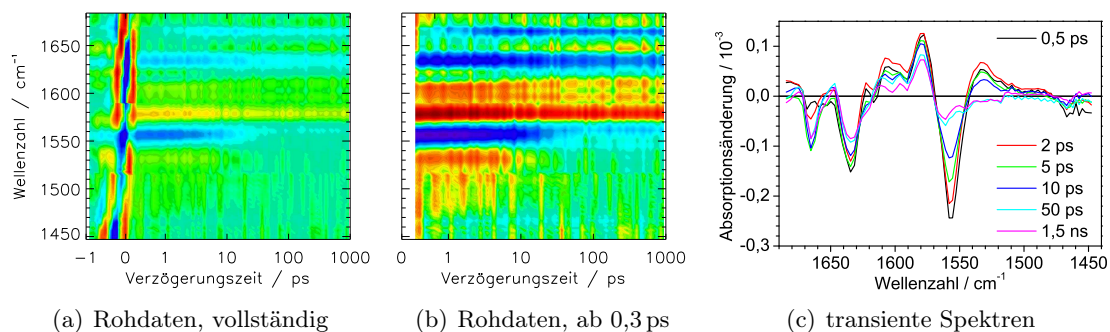


Abbildung 5.19: Transiente Absorptionsänderung von ChR-2 nach Anregung bei 430 nm, bestehend aus drei Einzelmessungen. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. In (a) ist die PFID-Signatur vor dem Zeitnullpunkt sowie die um den Zeitnullpunkt dominierende Kreuzphasenmodulation deutlich zu erkennen. In Abb. (b) wird nur der Zeitbereich ab 0,3 ps dargestellt, was zu einer etwas besseren Farbskala führt. Abb. (c) zeigt transiente Spektren ausgewählter Verzögerungszeiten.

Lebensdauer des angeregten Zustands von ChR-2 begründet, die nach transienten vis-Messungen im Subpikosekundenbereich liegt.

Eine vollständige Bandenzuordnung ist derzeit nicht möglich, im Einklang mit der Literatur [272, 273] und aufgrund der PFID-Signatur können dennoch die Bleichbanden bei 1558 cm⁻¹ der C=C- und die bei 1635 cm⁻¹ der C=N-Mode zugeordnet werden. Weiterhin wird wie bei PR eine negative Bande bei 1660 cm⁻¹ innerhalb der ersten Pikosekunde nach Photoanregung gebildet, die vermutlich eine Reaktion des Proteins auf die Isomerisierung des Retinals darstellt. Hierbei kann es sich um das Ausbleichen der Schwingungsmode einer benachbarten Seitenkette oder eine lokale Strukturänderung des Proteinrückgrats handeln. Die übrigen Signale sind vermutlich auf Seitenketten des Proteins zurückzuführen.

Die bei PR auftretenden intensiven und innerhalb von einigen zehn Pikosekunden stark schiebenden positiven Banden des Retinals treten hier nicht auf. Die Lage der Differenzbanden erscheint vergleichsweise statisch und nach etwa 50 ps bleibt das Photoproduktenspektrum praktisch konstant.

Insofern ist ChR-2 ein spannendes Untersuchungsobjekt, welches sich hervorragend für die transiente IR-Spektroskopie eignet. Möglicherweise können die fs-IR-Daten sogar für eine weitere Bandenzuordnung herangezogen werden. Aus der aufgezeichneten Dynamik kann auf schnelle, lokale Strukturänderungen geschlossen werden, da große Änderungen der Proteinstruktur nicht innerhalb dieser kurzen Zeitskala auftreten können.

Mit den zukünftigen Untersuchungen von ChR-2 und einer erweiterten Bandenzuordnung dürften sich in Hinblick auf die initialen Strukturänderungen des Retinals und seiner Umgebung wichtige neue Erkenntnisse über den Isomerisierungsprozess und seine Kontrolle durch das Protein ergeben. Diese könnten wiederum zu einem verbesserten Verständnis dieser Kontrollmechanismen auch in anderen Retinalproteinen beitragen.

6 Das photoschaltbare Collagen-Modellpeptid

Zu den Quellen gelangt man gegen den
Strom

(Stanislaw Jerzy Lec)

6.1 Einführung in photoschaltbare synthetische Peptide

Erste Experimente zur lichtgesteuerten Kontrolle von artifiziellen Peptiden durch azobenzolbasierte Photoschalter wurden 1995 von Fissi *et al.* veröffentlicht [274]. Ein in die Seitenketten eines Polylysins eingebautes Azobenzolderivat erlaubte über die mit der *cis/trans*-Isomerisierung verbundenen Änderungen der Geometrie und des Dipolmoments das Umschalten zwischen α -Helix und β -Faltblatt.

Eine wesentlich direktere Kontrolle der Peptidkonformation verfolgten Ulysse und Chmielewski. 1994 stellten sie ein Azobenzolderivat vor, das durch Einführung von Carboxy- und Aminofunktionen in der *para*-Position der Phenylringe eine photoschaltbare künstliche Aminosäure darstellt [275]. Somit war es möglich, die Azobenzol-Gruppe in das Rückgrat künstlicher Peptide zu integrieren und über die große Geometrieänderung bei der Isomerisierung direkt die Konformation des Peptides zu beeinflussen. Ein Jahr später wurde dies von derselben Gruppe demonstriert. Sie konnten in einem zyklischen Peptid mit integriertem Azobenzolschalter lichtgesteuert zwischen einer gestreckten Konformation und einer β -Schleife wechseln [276].

Dieser Einbau in das Peptidrückgrat ermöglicht zusammen mit der ultraschnellen Isomerisierung von Azobenzol auch die zeitaufgelöste Untersuchung struktureller Änderungen in kleinen Aminosäuresequenzen, da mit dem modifizierten Schalter ein sehr schneller Trigger zur Verfügung steht. Wachtveitl *et al.* beobachteten die Photodynamik eines Azobenzolderivates, des 4-(4'-Aminophenylazo)benzoats (*APB*), mittels Ultrakurzzeitspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich und wiesen bereits auf die mögliche Anwendung als Photoschalter hin [277]. Mittlerweile wurde diese für eine Reihe verschiedener Peptide mit in das Rückgrat eingebauten Pseudoaminosäuren aus modifizierten Azobenzolen demonstriert. Neben *APB* ist hier vor allem 4-(4'-Aminomethylphenylazo)benzoat *AMPB* zu nennen, wobei erstmals Informationen über die initialen Schritte der Peptid- und Proteinfaltung in Hinblick auf Geschwindigkeit und Triebkraft der Reaktion erhalten wurden [278–281].

Nachteil all dieser Experimente ist allerdings, dass die Aminosäuren im sichtbaren Spektralbereich nicht absorbieren und sich aus den transienten UV/vis-Spektren keine

direkten Aussagen über ihre Konformation ableiten lassen. Der Photoschalter Azobenzol dient also gleichzeitig als Initiator und einziger Indikator der Reaktion. So erscheint es nur naheliegend, die strukturellen Änderungen in lichtschtbaren Peptiden mittels transientser Infrarotspektroskopie zu verfolgen, was ebenfalls vielfach demonstriert wurde [22, 282–284].

Ähnliche Ansätze werden beispielsweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Andrew Woolley verfolgt. Dabei wird der Photoschalter nicht ins Peptidrückgrat integriert, sondern die Seitenketten zweier Aminosäuren werden durch ein Azobenzolderivat verbunden. Das hat den Vorteil, dass die natürliche Peptidstruktur nicht durch eine artifizielle Aminosäure gestört wird und den Nachteil, dass die Konformationskontrolle nur indirekt erfolgt. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass sich die Seitenkettenverbrückung eignet, um die Bildung einer α -helikalen Struktur in einer kurzen Peptidsequenz zu induzieren [285]. Die dabei auftretenden Änderungen konnten später von Bredenbeck *et al.* in einem Anreg-/Abtastexperiment mittels zweier gekoppelter Femtosekundenlaser im Zeitbereich von 2 ps bis 30 μ s im Infraroten verfolgt werden [22].

Auf einen weiteren Überblick über die Verwendung von azobenzolbasierten Photoschaltern zur Peptidkontrolle wird verzichtet. Einen Eindruck über die Vielfalt der Experimente, deren Randbedingungen und die daraus gewonnenen Informationen findet man z. B. in den Übersichtsartikeln von Renner und Moroder [24] oder Woolley [286].

Während dieser Arbeit wurden beide angesprochenen Möglichkeiten verwendet: Das untersuchte und im Folgenden präsentierte Modellcollagen verfügt über einen seitenkettenverbrückten Azoschalter. Daneben wurden aber auch die transienten Infrarotspektren verschiedener wasserlöslicher zyklischer und bizyklischer Peptide aufgenommen, deren Konformation über einen ins Rückgrat eingebauten Azoschalter beeinflusst werden kann. Unter anderem handelte es sich um die Sequenzen *cAMPB*(H₂O) und *bcAMPB*(H₂O) aus [281]. Diese Messungen wurden überwiegend zusammen mit Heike Staudt durchgeführt und ausgewertet. Sie werden erst zusammen mit weiteren Messungen an vergleichbaren Proben eine abgeschlossene Betrachtung und Interpretation ermöglichen. Deswegen – aber auch in Anbetracht des Umfangs dieser Arbeit – wird auf die Darstellung dieser Ergebnisse in dieser Dissertation verzichtet. In den nächsten Abschnitten wird eine allgemeine Einführung in die Substanzklasse des Azobenzols und seiner Derivate präsentiert, insbesondere die spektralen und photodynamischen Eigenschaften.

6.2 Azobenzole als Photoschalter

Azobenzol besteht aus zwei Phenylringen die über eine Azogruppe ($-\text{N}=\text{N}-$) miteinander verbunden sind, wobei wegen der Doppelbindung zwischen den Stickstoffatomen zwei Konfigurationsisomere (*trans*-AB und *cis*-AB, siehe Abb. 6.3(a) auf S. 156) auftreten. Der systematische Name gemäß den Empfehlungen der *IUPAC* ist (*E*)-Diphenyldiazen für das *trans*-Isomer und (*Z*)-Diphenyldiazen für das *cis*-Isomer [287, 288]. Für die hier verwendeten Substanzen sind jedoch Verwechslungen ausgeschlossen, daher werden im Folgenden ausschließlich die Bezeichnungen *trans* und *cis* sowie der Trivialname Azobenzol

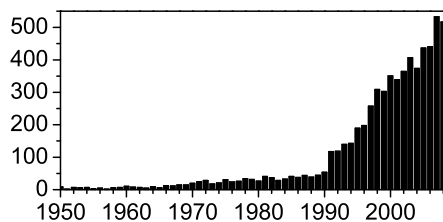


Abbildung 6.1: Anzahl der jährlichen Veröffentlichungen über Azobenzol. Die Zahlen sind das Ergebnis einer Suche nach „Azobenzene“ in der Datenbank „ISI – web of knowledge“ [293].

(*AB*) verwendet. Als kleinste aromatische Azoverbindung ist es die Stammsubstanz der Azofarbstoffe und wird aufgrund seiner intensiven orangen Färbung seit vielen Jahrzehnten industriell eingesetzt.

Die Darstellung durch Reduktion von Nitrobenzol in alkalischer Lösung wurde bereits vor über 150 Jahren von Mitscherlich beschrieben [289], allerdings blieb die Struktur – insbesondere die Konfiguration der Stickstoffdoppelbindung – noch lange ungeklärt. Im Jahr 1937 entdeckte Hartley, dass *trans*-*AB* durch Belichtung in *cis*-*AB* überführt werden kann und sich die beiden Isomere in Löslichkeit, Dipolmoment und Farbe unterscheiden [290]. Die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Isomere erlauben eine chromatographische Trennung [291] und mittels Röntgenstreuung konnte schließlich zweifelsfrei die Konfiguration der beiden Stereoisomere aufgeklärt werden [292].

Ein Blick auf die Zahl der jährlichen Veröffentlichungen zeigt, dass das wissenschaftliche Interesse zum Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts sprunghaft angestiegen ist (Abb. 6.1). Das ist der Tatsache geschuldet, dass zusammen mit der rasanten Entwicklung der Mikro- und Nanotechnik sowie der optischen Technologien ebenfalls das Interesse an optisch manipulierbaren Materialien gestiegen ist und sich aus dem Azobenzol-Grundgerüst durch Substitution an den Phenylringen eine ganze Familie von Farbstoffen ableiten lässt. Diese häufig ebenfalls als *Azobenzole* bezeichneten Derivate unterscheiden sich je nach gewählter Substitution in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, so dass sich für unterschiedlichste Anwendungen optimierte Moleküle herstellen lassen.

6.2.1 Strukturen des Azobenzols

Die genaue Struktur der *trans*- und der *cis*-Form des Azobenzols ist nicht eindeutig geklärt, da sich Ergebnisse verschiedener Untersuchungen widersprechen.

Robertson hatte in Röntgenstrukturanalysen im Wesentlichen eine planare Struktur des *trans*-*AB* erhalten, wobei es Hinweise auf eine Verkipfung der Phenylringe gegen die N=N-Bindungsachse von 15° gab. Folglich wurde für *trans*-*AB* zunächst eine planare Struktur mit C_{2h} Symmetrie angenommen [294, 295], was durch weitere Röntgenstreuexperimente gestützt wurde [296, 297]. Erste Gas-Elektronenbeugungsversuche zeichneten jedoch ein anderes Bild: die Phenylringe sollten hier um 30° gegen die N=N-C Ebene verkippt sein [298]. Die Daten geben keine Auskunft über die Richtung der Drehung, so dass sich für den Fall der Drehung der Phenylgruppen in dieselbe Richtung eine C_2 -Symmetrie

und bei entgegengesetzter Drehung eine C_i -Symmetrie ergibt. Die C_i -Symmetrie wurde auch in den jüngeren Röntgenbeugungsexperimenten für den Kristall [299, 300] sowie bei quantenchemischen und DFT-Rechnungen für die Gasphase gefunden [301]. Andererseits ergaben neue Elektronenbeugungsexperimente [300] ebenso wie weitere quantenchemische Rechnungen [302–304] die planare C_{2h} -Symmetrie für die Gasphase.

Für *cis*-AB sind weniger experimentelle Daten vorhanden: erste Röntgenstrukturanalysen von Robertson ergaben eine zweizählige Symmetrieachse und eine Verkippung der Phenylringe um etwa 50° zur N=N–C-Ebene [292], was zwei Jahre später auf 56° korrigiert wurde [305]. Untersuchungen der spektralen Eigenschaften von Azobenzol und anderen Azoverbindungen gehen von einer C_{2v} -Symmetrie aus [294, 295], wobei teilweise nur die lokale Symmetrie an den Stickstoffatomen beachtet wurde. Die Auswertung von Raman-Messungen und Rechnungen mittels Dichtefunktionaltheorie ergaben Winkel von $53,5^\circ$ und eine C_2 -Symmetrie [301]. Spätere *ab initio* Rechnungen lieferten Winkel von $53,6^\circ$ [303] oder auch 62° [304].

Entscheidend für viele Anwendungen des Azobenzols und seiner Derivate ist die große Änderung der Molekülgeometrie durch die Isomerisierung. Die Angaben zu den Abständen der Kohlenstoffatome in den *para*-Positionen der Phenylringe unterscheiden sich leicht, jedoch liegen sie für *trans*-AB im Bereich von 9 \AA bis 11 \AA und für *cis*-AB im Bereich von $5,5 \text{ \AA}$ bis 7 \AA [23, 27, 296, 304–307]. Es ist also eine Änderung des Abstandes von einigen Ångström zu erwarten. Aus sterischen Gründen ist das *trans*-Isomer energetisch günstiger, der Unterschied zwischen den Konfigurationen beträgt etwa 50 kJ/mol , die Aktivierungsenergie für die *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung etwa 90 kJ/mol [295]. Durch Wärmezufuhr (Δ) kann man also stets das reine *trans*-AB erhalten, die Zeitkonstanten für die thermische Rückisomerisierung bei Raumtemperatur liegen bei Stunden bis Tagen (vgl. Abb. 6.3(b), S. 156).

6.2.2 Photochemie des Azobenzols

Die spektroskopischen Eigenschaften verschiedener organischer Azoverbindungen wurden bereits vor Jahrzehnten von Rau verglichen und publiziert [294, 295]. Die UV/vis-Absorptionsspektren des hier als Photoschalter eingesetzten Azobenzolderivates (Abb. 6.9(a), S. 166) stimmen gut mit denen von reinem Azobenzol in Dimethylsulfoxid (*DMSO* [131]) überein. Es wird daher davon ausgegangen, dass die für Azobenzol akzeptierte Bandenzuordnung hier ebenfalls anwendbar ist.

Beide AB-Isomere besitzen eine schwache, unstrukturierte Bande mit einem Maximum bei ca. 440 nm , die dem $S_1(n\pi^*)$ Übergang zuzuordnen ist. Diese ist für *cis*-AB etwa dreimal größer als für *trans*-AB [294, 295], was auf den Auswahlregeln für optische Übergänge und den gegebenen Molekülsymmetrien beider Konfigurationen beruht. Für die C_{2v} bzw. C_2 Symmetrie des *cis*-Isomers ist der niedrigste $n\pi^*$ -Übergang optisch erlaubt, während er für ein planares *trans*-AB mit C_{2h} Symmetrie optisch verboten ist. Die vergleichsweise hohe Absorption ist die Folge von Deformationen der planaren Struktur und Kopplungen der elektronisch angeregten Zustände durch Molekülschwingungen [308].

Lösungsmittel	$\Phi_{trans \rightarrow cis}$		$\Phi_{cis \rightarrow trans}$	
	$S_1(n\pi^*)$	$S_2(\pi\pi^*)$	$S_1(n\pi^*)$	$S_2(\pi\pi^*)$
<i>n</i> -Hexan	0,25	0,11	0,56	0,27
Brom-Ethan	0,26	0,11	0,58	0,25
Ethanol	0,28	0,15	0,51	0,24
Wasser/Ethanol (4:1)	0,35	0,21	0,41	0,15

Tabelle 6.1: Abhängigkeit der Isomerisierungsquantenausbeute für Azobenzol vom Lösungsmittel und der Anregungsenergie. Die Anregung in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand erfolgte bei 439 nm, die in den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand bei 317 nm [311].

Die spektral deutlich getrennte S_2 -Bande besitzt bei *trans*-AB ein Maximum bei ca. 320 nm und bei *cis*-AB ein Maximum bei 290 nm. Es handelt sich um einen $\pi\pi^*$ -Übergang, das größere Überlappungsintegral der Wellenfunktionen aus Grund- und angeregtem Zustand ist verantwortlich für die im Vergleich zum $S_1(n\pi^*)$ -Übergang erheblich stärkere Absorption in diesem Bereich. Eine Schwingungsfeinstruktur dieser Bande wurde nur bei der *trans*-Form nachgewiesen [295, 309]. Die beiden Absorptionsbanden sind relativ unempfindlich auf die Polarität des Lösungsmittels [295].

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist sehr klein und liegt für *trans*-AB zwischen 8×10^{-7} ($S_1(n\pi^*)$) und 3×10^{-5} ($S_2(\pi\pi^*)$) [310], Übergänge ins Triplettssystem oder andere Reaktionen sind ebenfalls vernachlässigbar [311]. Deshalb wurde bereits früh vermutet, dass der elektronisch angeregte Zustand durch interne Konversion in den Grundzustand schnell und effizient entvölkert wird, wobei mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das jeweils andere Isomer gebildet wird.

Die Isomerisierungsquantenausbeuten (Tab. 6.1) sind für die *cis* \rightarrow *trans*-Reaktion allgemein größer als für *trans* \rightarrow *cis*. Außerdem sind sie abhängig von der Anregungsenergie: Die Anregung des S_1 -Zustand besitzt verglichen mit dem S_2 -Zustand etwa die doppelte Isomerisierungswahrscheinlichkeit, was auf unterschiedliche Reaktionspfade und -mechanismen schließen lässt. Diese Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes vom photoangeregten Zustand stellt somit eine Ausnahme von *Kashas Regel* [60, 61] dar. Diese besagt, dass die interne Konversion aus höher angeregten Zuständen so schnell ist, dass alle photochemischen Prozesse unabhängig von der Anregungsenergie denselben Ausgangszustand besitzen. Das ist hier offensichtlich nicht gegeben.

6.2.3 Isomerisierungsmechanismus von Azobenzol

Der genaue Mechanismus der Isomerisierung ist auch heute noch Gegenstand kontroverser Diskussionen, wobei weder experimentelle noch theoretische Befunde zur einer eindeutigen Klärung geführt haben. Mit 24 Atomen ergeben sich für AB 66 ($3N - 6$) interne Freiheitsgrade, so dass man nicht von der *einen* Reaktionskoordinate im Sinne einer einfachen Geometrieänderung sprechen kann. Statt dessen ist zu erwarten, dass sich verschiedene Koordinaten während der Photoreaktion verändern. Die beobachtete

Isomerisierung stellt folglich den Mittelwert einer Ensemble-Messung von Trajektorien auf der multidimensionalen Potentialenergiefläche dar. Ein Reaktionsmodell sollte also alle experimentellen Befunde konsistent erklären und dabei die Frage beantworten, welches die größten bzw. wichtigsten Geometrieänderungen entlang dieses Pfades sind. Ein Beispiel für einen komplexeren Reaktionspfad ist der *Hula Twist* Mechanismus [312] der ebenso für Stilben [313] oder Provitamin D [314] sowie für die *cis-/trans*-Isomerisierung weiterer Diene bzw. Polyene wie Retinal in Bacteriorhodopsin [315] vorgeschlagen wurde. Dabei handelt es sich um eine konzertierte Rotation um zwei benachbarte konjugierte Doppelbindungen, wobei im Fall von *trans*-AB ein Stickstoffatom aus der Molekülebene herausdreht und so eine Inversion des Phenylrings ermöglicht. Diese Bewegung eines einzelnen Atoms war der Grund für die Namensgebung. Die experimentelle und theoretische Verifikation oder Falsifikation dieser komplexen Trajektorien ist nur schwer durchzuführen und es sind weitere Vereinfachungen notwendig. Beispielsweise kann man die Untersuchung der Isomerisierung auf die Betrachtung der wichtigsten Freiheitsgrade reduzieren [295], wie es in Abb. 6.2 wiedergegeben wird. Hier wird zwischen drei möglichen Reaktionsmechanismen unterschieden:

Rotation: Ein Phenylring rotiert um die N=N-Bindungsachse, dies ist mit einer großen Bewegung dieser Gruppe durch das Lösungsmittel verbunden.

konzertierte Inversion: Beide Phenylringe drehen sich in der C-N=N-C-Ebene, so dass ein linearer Übergangszustand eingenommen wird. Dabei wird von der Aufhebung des Doppelbindungscharakters der Azogruppe im angeregten Zustand ausgegangen [316].

Inversion: Eine der Phenylgruppen bewegt sich in der N=N-C-Ebene. Der Übergangszustand ist semi-linear und die Bewegung ähnelt der Inversionsschwingung des Ammoniaks.

Selbst innerhalb dieses bereits stark vereinfachten Bildes konnte bislang noch keine Einigkeit in Hinblick auf den Reaktionsmechanismus erzielt werden.

Experimentelle Arbeiten zur Isomerisierung von Azobenzol

Da im Rahmen dieser Arbeit nicht mit reinem Azobenzol gearbeitet wurde und der genaue Mechanismus für die durchgeführten Untersuchungen eine untergeordnete Rolle spielt, wird lediglich ein Überblick über die derzeitige Literatur geliefert. Eine übersichtliche Zusammenstellung der Literatur bis zum Jahr 2000 findet sich in [317]. Zwar soll die enorme Komplexität der zum Teil widersprüchlichen experimentellen und theoretischen Arbeiten widerspiegelt werden, auf eine Wertung oder Bevorzugung des einen oder anderen Modells wird jedoch bewusst verzichtet.

Die Arbeiten am Ende der 70er Jahren des letzten Jahrhunderts liefern nur indirekte Informationen über die molekularen Vorgänge: Wegen der unstrukturierten Absorptionsbanden und der sehr geringen Fluoreszenzquantenausbeute war eine genauere spektroskopische Untersuchung der angeregten Zustände praktisch ausgeschlossen. Die

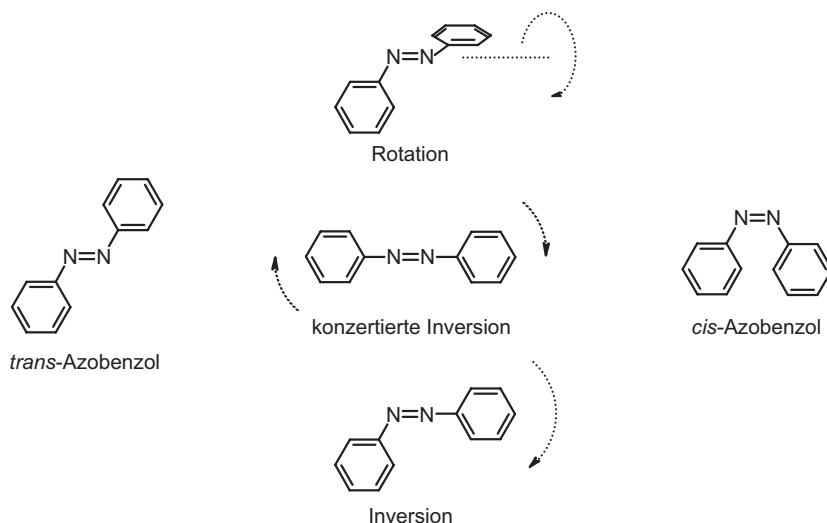


Abbildung 6.2: Mögliche Reaktionspfade für die Isomerisierung von Azobenzol nach Photoanregung [295, 316]: 1. Rotation des Phenylinges um die N=N-Bindung, 2. konzertierte Inversion beider Phenylinge in der Ebene mit linearem Übergangszustand, 3. Inversion eines Phenylinges.

Ultrakurzzeitlaserspektroskopie zur direkten Verfolgung der Photoreaktion stand noch nicht zur Verfügung, genauso wie die umfangreichen theoretischen Ansätze zur Berechnung angeregter Zustände oder die Simulation der Moleküldynamik.

Bortolus und Monti folgerten aus der Abhängigkeit der Isomerisierungsquantenausbeuten von der Anregungsenergie und der Polarität des Lösungsmittels, dass sich die Mechanismen für die Deaktivierung des S_1 - und des S_2 -Zustands unterscheiden. Aus Untersuchungen von triplett-sensibilisiertem Azobenzol schlossen sie, dass Tripletzustände für die direkte Photoisomerisierung keine Rolle spielen [311].

Rau und Lüddecke untersuchten die Photoreaktion zweier Azobenzophane, für die aufgrund ihrer zyklischen Verbrückung der Rotationskanal sterisch blockiert ist [318], was genauere Aussagen über die Isomerisierungscoordinate ermöglicht. Es ergaben sich identische Quantenausbeuten für $S_1(n\pi^*)$ - und $S_2(\pi\pi^*)$ -Anregung, die mit den Werten für die $S_1(n\pi^*)$ -Anregung von reinem Azobenzol übereinstimmen. Weiterhin unterschieden sich die UV/vis-Absorptionsspektren der rotationsgehinderten Azobenzophane im Bereich der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande von denen des Azobenzols, waren jedoch nahezu identisch im Bereich der $S_1(n\pi^*)$ -Bande. Daraus wurde abgeleitet, dass nach $S_1(n\pi^*)$ -Anregung die Isomerisierung durch Inversion erfolgt, während die Reaktion aus dem $S_1(n\pi^*)$ -Zustand die Rotation ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Diese Schlussfolgerung wurde später von Rau und Yu-Quan weiter bestätigt, die vergleichbare Ergebnisse für die Isomerisierung von Azobenzolen mit unterschiedlich großen Substituenten in *ortho*- und *para*-Position fanden [319].

Erste Ultrakurzzeitexperimente am Ende der 90er Jahre ermöglichten schließlich direkte Aussagen zur Moleküldynamik. 1996 präsentierten Lednev *et al.* transiente

Absorptionsmessungen an *trans*-AB in Hexan nach Anregung in den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand [320], wobei die beobachteten Dynamiken der Zustände auf der Basis des Potentialmodells von Monti *et al.* interpretiert wurden. Zwei Jahre später wurden diese Experimente mit verbesserter Zeitauflösung bei verschiedenen Anregungsenergien reproduziert und die Interpretation weiter verfeinert [321]: Der $S_1(n\pi^*)$ -Zustand zerfällt über interne Konversion mit einer Zeitkonstanten von 2,5 ps in den Grundzustand, wobei es auch zur Isomerisierung entlang der Inversionskoordinate kommt. Bei kürzerwelliger Anregung in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand wurde eine zusätzliche Komponente mit $\tau \leq 200$ fs beobachtet, die der Schwingungsrelaxation im S_1 zugeordnet wurde. Anregung in den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand zeigte den sehr schnellen Aufbau eines Intermediates ($\tau \leq 200$ fs), was der Bewegung aus der Franck-Condon Region auf der S_2 -Fläche entlang einer Torsionskoordinate zugeordnet wurde. Interne Konversion führte mit einer Zeitkonstanten von ca. 0,9 ps aus dem S_2 in einen metastabilen Bereich der S_1 -Fläche, wobei sich die verdrehte Geometrie deutlich von der bei direkter $S_1(n\pi^*)$ -Anregung unterschied. Die Repopulationskinetik des Grundzustands wurde mit $\tau = 15$ ps angegeben, wobei zum Mechanismus und den Reaktionskoordinaten dieses Prozesses keine Stellung bezogen wurde. Der Vergleich transienter Absorptionsmessungen an reinem Azobenzol und einem mit Azakronenether verbrückten Azobenzol, für das die Rotation blockiert ist, bekräftigten das Modell dieser dualen Photochemie weiter [322].

Nägele *et al.* führten vergleichbare Experimente mit *trans*- und *cis*-AB in Ethanol und Anregung in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand durch und kamen zu ähnlichen Ergebnissen [323]: Für *cis*-AB wurde eine biexponentielle Kinetik mit 170 fs und 2 ps beobachtet, wobei die schnellere Komponente dominiert. Eine ebenfalls beobachtete, stark wellenlängenabhängige Zeitkonstante im Bereich von 10–20 ps wurde als Kühlprozess heißer Grundzustandsmoleküle interpretiert. Das stimmt mit Ergebnissen transientser Spektroskopie im infraroten Spektralbereich [62] sowie der direkten Bestimmung des Temperaturanstiegs aus der Analyse akustischer Frequenzverschiebungen in *Transient Grating* Messungen [324] überein. Die Zuordnung der langsamen Komponente zu Kühlprozessen wurde später auch von zeitaufgelösten Raman Messungen an *trans*-AB bestätigt [325]. Die transienten Absorptionsspektren im UV/vis-Bereich wurden von Satzger *et al.* für Azobenzol in DMSO nach Anregung in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand reproduziert. Dabei wurden ähnliche Zeitkonstanten erhalten und der Vergleich der ebenfalls gemessenen, sehr schwachen Emissionsbanden der Isomere lieferte weitere Informationen über die beteiligten elektronischen Zustände [326]. Später wurden diese Experimente von derselben Gruppe mit Ethanol als Lösungsmittel wiederholt und um die $S_2(\pi\pi^*)$ -Anregung erweitert [327]. Für die geringere Isomerisierungsquantenausbeute des S_2 -Zustands wurde die Möglichkeit eines im Vergleich zur direkten $S_1(n\pi^*)$ -Anregung geänderten Aufteilungsverhältnis der Isomere durch den veränderten Startpunkt der Dynamik auf der S_1 -Fläche ebenso diskutiert wie ein alternativer Reaktionspfad, der nach der Anregung direkt in den Grundzustand zurückführt. Ein Hinweis auf die letzte Möglichkeit ergibt sich aus fs-zeitaufgelösten Photoelektronenspektren, die Schultz *et al.* nach Anregung im Bereich von 280 nm bis 350 nm aufgenommen haben [328, 329]. In diesem Bereich wurden zwei Photoelektronenbänder (α und β) mit unterschiedlicher Lebensdauer gefunden und

der Ionisierung aus dem $S_2(\alpha)$ bzw. aus höheren Zuständen $S_{3,4}(\beta)$ zugeordnet. Diese Zustände werden aufgrund der teilweise überlappenden Absorptionsbanden bei Anregung des $S_2(\pi\pi^*)$ ebenfalls populiert und relaxieren ohne Isomerisierung direkt in den Grundzustand.

Erste zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von *trans*-AB in Hexan nach Anregung in den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand von Fujino *et al.* [310] und in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand von Lu *et al.* [330] ergaben qualitativ dieselben Zeitkonstanten wie die transiente Absorption. Fujino *et al.* schlossen jedoch aus der Ähnlichkeit der Absorptions- und Emissionsbanden auf ebenfalls planare Strukturen der emittierenden Zustände. Zusammen mit der aus ihren experimentellen Befunden errechneten Quantenausbeute von 100 % für den ($S_2 \rightarrow S_1$)-Übergang wurde dies als Beleg gegen die Rotation als wesentliche Koordinate nach $S_2(\pi\pi^*)$ -Anregung gewertet. Lu und Mitarbeiter konnten aus ihren Messungen zwar keine direkte Informationen über die strukturelle Dynamik ableiten, aber sie stützten ihre Interpretation auf neuere Rechnungen auf CASSCF-Niveau [331] und in diesem Modell erfolgt die Isomerisierung auf der S_1 -Fläche im Wesentlichen entlang einer Rotationskoordinate.

Um zwischen Inversion- und Rotationspfad zu unterscheiden untersuchten Lu *et al.* die transiente Emission von substituierten Azobenzolen mit ungehindertem bzw. von Azobenzophanen mit unterschiedlich stark eingeschränktem Rotationsfreiheitsgrad [332]. Für alle Moleküle ergab sich nach Anregung des $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustands eine ultraschnelle Relaxation in der Größenordnung der Zeitauflösung (≈ 100 fs) zum S_1 -Zustand, was als weiterer Hinweis gegen die Rotationsbewegung aus der Franck-Condon-Region gewertet wurde. Die Lebensdauer des direkt angeregten $S_1(n\pi^*)$ -Zustands verlängerte sich jedoch für das stark rotationseingeschränkte Azobenzophan um den Faktor 10 gegenüber dem nicht eingeschränkten Azobenzolderivat, so dass hier die Bedeutung des Rotationsfreiheitsgrades für die Deaktivierung des S_1 -Zustands offensichtlich erschien.

Diese Interpretation steht jedoch im Gegensatz zu Messungen die Pancur *et al.* an ähnlichen Systemen durchgeführt hatten [333, 334]: Sie untersuchten die transienten Fluoreszenzsignale (*trans* \rightarrow *cis*) von reinem Azobenzol, von einem mit Azokronenether überbrücktem und somit rotationsgehindertem Derivat sowie von einem letzteren chemisch ähnlichen Derivat ohne Einschränkung der Rotation jeweils in Dioxan. Dabei wiesen die beiden substituierten Azobenzole dieselbe Kinetik auf, die im Vergleich zu reinem Azobenzol deutlich verlangsamt war. Demzufolge wurde die Bedeutung der Torsionskoordinate für die Isomerisierung infrage gestellt und statt dessen die Inversion oder ein komplexerer Mechanismus wie der *hula twist* favorisiert.

Chang *et al.* führten zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen an *trans*-AB nach Anregung in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand durch und verglichen die Anisotropieabklingdauern für verschiedene Lösungsmittel [335]. Aus der schnelleren Depolarisation bei Hexan im Vergleich zu Ethylenglykol wurde geschlossen, dass der Reaktionspfad von der Viskosität abhängt: in niederviskosen Lösungsmitteln soll die Reaktion entlang einer Drehschwingung der CNNC-Ebene erfolgen, bei hochviskosen Lösungsmitteln dagegen über eine konzertierte Inversion. Dabei würden die $S_1 \rightarrow S_0$ Übergänge durch unterschiedliche konische Durchschneidungen, also bei unterschiedlicher Molekülgeometrie erfolgen.

Nachteil aller bisher dargestellten experimentellen Daten ist der nur indirekte Zugang zur Struktur. Aufgrund der breiten und unstrukturierten Banden für Absorption und Emission im UV/vis Bereich können Änderungen der Molekülkonformation und somit der Reaktionspfad und die wesentlichen Reaktionskoordinaten hier nicht aufgelöst werden. Die vielfältig eingesetzten substituierten Azobenzole sind insofern kritisch zu betrachten, als dass neben der Blockierung eines Reaktionspfades noch weitere Einflüsse wie die Änderung der elektronischen Struktur, weitere sterische Einflüsse, Änderungen der Lebensdauern der angeregten Zustände usw. zu berücksichtigen sind. Überdies wurde die *trans/cis*-Isomerisierung beispielsweise auch bei Stilbenophanen nachgewiesen, die nicht über die Möglichkeit einer Inversionsreaktion verfügen [336]. Daher muss die Frage nach der Blockierung des Rotationspfades und der daraus gezogene Schluss auf die Inversionsbewegung kritisch betrachtet werden. Auch hier lassen sich demzufolge nur sehr indirekte Aussagen machen. Besser geeignet sind Methoden, die bereits inhärent Strukturinformationen liefern und gleichzeitig eine hohe Zeitauflösung besitzen, um die Änderungen der Konformation innerhalb der Lebensdauern der angeregten Zustände aufzulösen – also Infrarot- und Ramanspektroskopie.

Biswas und Umapathy führten Resonanz-Raman Messungen an *trans*-AB im Bereich der $S_1(n\pi^*)$ -Bande durch und verglichen die gewonnenen Raman-Anregungsprofile mit den Absorptionsspektren und der Simulation der Wellenpaketsdynamik [337]. Diese Methode liefert keine Information über die Dynamik, aber über die Frequenzverschiebung der einzelnen Raman-aktiven Schwingungsmoden nach der Anregung. Da die größten Änderungen in den N=N und C-N Moden beobachtet wurden, wurde dies als Nachweis für den Inversionsmechanismus gewertet, der hier erstmals direkt aus spektroskopischen Daten erfolgte und etwas später durch weitere Messungen derselben Autoren bestätigt wurde [338].

Stuart *et al.* nutzten ebenfalls die Analyse der Resonanz-Raman Intensitäten um daraus die Dynamik von *trans*- und *cis*-AB in Ethanol nach Anregung in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand abzuleiten [339]. Während für *trans*-AB die stärksten Änderungen in der CNN-Beuge- und den NN- und CN-Streckschwingungen bestätigt wurde, ergab sich für *cis*-AB ein anderes Bild: Hier zeigte die Analyse große Änderungen ($\approx 6^\circ$ – 20°) für den CNNC-Diederwinkel, aber nur kleine ($\leq 3^\circ$) für den CNN-Bindungswinkel. Daraus wurde geschlossen, dass nach $S_1(n\pi^*)$ -Anregung *trans*-AB durch Inversion und *cis*-AB durch Rotation relaxiert.

Chowdary und Umapathy vervollständigten diese Arbeiten durch Auswertung der Resonanz-Raman-Intensitäten und -Anregungsprofile und entsprechende Rechnungen für die $S_2(\pi\pi^*)$ -Anregung von *trans*-AB [340]. Für die Deaktivierung wurden zwei konkurrierende Reaktionspfade vorgeschlagen: Der erste entspricht einer direkten internen Konversion in den S_1 ohne Rotationsbewegung. Der zweite führt entlang einer Rotationskoordinate in einen kreuzenden Zustand S_3 wie er zuvor in zeitaufgelösten Photoelektronenspektren identifiziert wurde (s. o.) [328, 329]. Aus dem S_3 heraus kommt es entweder zur direkten Rückkehr in den Grundzustand S_0 oder zur Population des S_1 .

Eine direkte Messung der Strukturdynamik wurde von Fujino und Tahara für *trans*-AB in Hexan und Ethylenglykol veröffentlicht [325]. Sie analysierten transiente Resonanz-Raman-Spektren mit Pikosekunden-Zeitauflösung nach Photoanregung bei 273 nm in

der kurzwelligen Flanke der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande. Die beobachteten Stokes und anti-Stokes Linien der teilweise isotopenmarkierten Proben wurden den Schwingungsfrequenzen der beteiligten elektronischen Zustände (S_2, S_1, S_0) zugeordnet. Aus der Ähnlichkeit der für den S_1 - und den S_0 -Zustand erhaltenen Frequenzen der N=N-Schwingung wurde der Doppelbindungscharakter dieser Bindung im angeregten Zustand gefolgert. Insgesamt ergab sich folgendes Reaktionsschema: Nach Anregung in den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand kommt es zur schnellen internen Konversion in den S_1 (≈ 200 fs), dabei finden keine größeren Änderungen der Molekülgeometrie statt. Auf der S_1 -Fläche folgt darauf die Schwingungsrelaxation und die Isomerisierung durch Inversion. Die bekannte Abhängigkeit der S_1 -Lebensdauer von der Viskosität des Lösungsmittels wurde mit diesen Daten ebenfalls nachgewiesen (≈ 1 ps in Hexan und ≈ 12 ps in Ethylenglykol). Nach Übergang in den Grundzustand S_0 liegen schwingungsangeregte Moleküle vor, die wiederum einen Kühlprozess durchlaufen. Die Abhängigkeit der Lebensdauer des S_1 -Zustands von der Art der Anregung ($S_2(\pi\pi^*)$ vs. $S_1(n\pi^*)$) wird durch die Schwingungsenergieumverteilung erklärt. Diese ist langsamer als der Zerfall des direkt angeregten $S_1(n\pi^*)$ -Zustands. Bei UV-Anregung in den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand wird in transienten Absorptionmessungen aufgrund der Umverteilung der größeren Überschussenergie eine Verlängerung der S_1 -Lebensdauer gefunden. Eine Isomerisierung durch Rotation wird unabhängig von der Art der Anregung ausgeschlossen.

Saito und Kobayashi untersuchten die mit sub-10 fs Pulsen induzierte kohärente Wellenpaketsdynamik von Methylgelb (4-Dimethylamino)-Azobenzol [341]. Dabei werden die Schwingungsfrequenzen aus den Oszillationen der transienten Absorptionssignale gewonnen: aufgrund der sehr hohen Zeitauflösung können so transiente Frequenzverschiebungen und ihre Phasenbeziehung bestimmt werden. Der spektral breite Anregungspuls und die im Vergleich zu unsubstituiertem Azobenzol rotverschobene $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande führten dazu, dass zu etwa 70 % der $S_2(\pi\pi^*)$ - und zu 30 % der $S_1(n\pi^*)$ -Zustand angeregt wurden. Die NN- und CN-Schwingungen wiesen eine dynamische Kopplung durch niederfrequente Moden (≈ 65 cm^{-1} bzw. 100 cm^{-1}) auf, die der CNNC-Torsion, also der Rotationskoordinate, zugeordnet wurden. Fazit dieser Publikation ist, dass eine getrennte Betrachtung von Rotation und Inversion aufgrund der Kopplung zwischen beiden Schwingungsmoden prinzipiell keine hinreichende Modellierung liefern kann.

Theoretische Arbeiten zur Isomerisierung von Azobenzol

Neben den vielen – zum Teil widersprüchlichen – experimentellen Ergebnissen gibt es auch zahlreiche theoretische Arbeiten zu dieser Kontroverse. Es werden jedoch nicht immer alle experimentelle gefundenen Aspekte berücksichtigt, so dass die Klärung der photochemischen Prozesse durch diese Arbeiten ebenfalls nur eingeschränkt möglich ist.

Erste *ab initio* Rechnungen wurden von Monti *et al.* durchgeführt [342]. Wegen der auf der $S_2(\pi\pi^*)$ -Fläche gefundenen Minima wurde angenommen, dass dieser Zustand über interne Konversion sowohl wieder den ursprünglichen Grundzustand als auch den S_1 -Zustand populierte und dass die Isomerisierung nur aus dem S_1 -Zustand heraus erfolgt. Im Bereich der Grundzustandsgeometrien besitzen die Potentialkurven des $S_1(n\pi^*)$ -

Zustands entlang der Inversions- und Rotationskoordinaten einen steilen Gradienten, was die Strukturlosigkeit der ($n\pi^*$)-Bande in den UV/vis-Absorptionsspektren erklärt. Über welchen Pfad die Reaktion bevorzugt abläuft konnte anhand der Rechnung nicht entschieden werden, jedoch wurde die Beteiligung eines Triplettzustands ausgeschlossen.

Cattaneo und Persico berechneten die potentielle Energie der Rotations- und Inversionspfade für die energetisch niedrigsten Zustände mittels CASSCF und CIPSI (ein Multireferenz-Störungstheorie Algorithmus) [343]. Mit dieser Arbeit wurde das bis dahin weitgehend akzeptierte Reaktionsmodell von Monti *et al.* zum großen Teil befürwortet: die thermische *cis* \rightarrow *trans* Isomerisierung im Grundzustand erfolgt über die Inversion, wahrscheinlich ebenso die Reaktion aus dem $S_1(n\pi^*)$ -Zustand nach Photoanregung. Allerdings konnte für die Deaktivierung des $S_1(n\pi^*)$ -Zustands die Torsion nicht ausgeschlossen werden. Für den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand wurde ein konischer Schnitt mit einem höher angeregten Zustand identifiziert, der einen steilen Gradienten in der Torsionskoordinate aufweist. Demnach findet zunächst der Übergang durch die konische Durchschneidung statt, danach erfolgt die Isomerisierung durch Torsion auf der neuen Zustandsfläche. Der Inversionsmechanismus für den Grundzustand wurde durch Molekulardynamiksimulationen von Ikegami *et al.* bestätigt [344].

Im Gegensatz dazu stehen verschiedene neuere Arbeiten, die alle die Bedeutung des Inversionsmechanismus für die Photoreaktion anzweifeln:

Ishikawa *et al.* berechneten zweidimensionale Potentialenergieflächen für die niedrigsten Zustände (S_0 , $S_1(n\pi^*)$, $S_2(\pi\pi^*)$, $S_3(n^2\pi^{*2})$) mit CASSCF und MRCISD, die sich deutlich von den Kurven bei Monti *et al.* unterscheiden [331]. Für den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand wurden Minima bei der *trans*- und *cis*-Konformation gefunden, so dass eine Geometrieänderung auf dieser Fläche nicht stattfinden kann. Statt dessen soll es zur Konversion in den S_1 - oder den S_3 -Zustand mit anschließender Isomerisierung kommen. Die Untersuchung der S_1 -Fläche ergab nur eine konische Durchschneidung mit dem Grundzustand und diese ist entlang des Rotationspfades lokalisiert. Daher wird hier die Inversion als Deaktivierungsmechanismus des $S_1(n\pi^*)$ -Zustands ausgeschlossen.

Gagliardi *et al.* kamen auf der Basis von MS-CASPT2 und TD-DFT Rechnungen zu vergleichbaren Ergebnissen [345]. Auch hier wurde die kurze Lebensdauer des $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustands durch die schnelle Deaktivierung über den kreuzenden, doppelt angeregten $S_3(n^2\pi^{*2})$ -Zustand erklärt. Der Inversionspfad konnte weder im S_2 - noch im S_1 -Zustand gefunden werden, jedoch ergaben sich weitere konische Durchschneidungen zwischen dem $S_1(n\pi^*)$ -, dem $T_1(n\pi^*)$ - und dem Grundzustand, was mit dem Ergebnis von CASPT2-Rechnungen derselben Gruppe übereinstimmt [304]. Demzufolge stellt der Triplettzustand einen weiteren Deaktivierungspfad für den S_1 dar.

Im Einklang mit diesen Studien und dem daraus gefolgerten Mechanismus berechneten Conti *et al.* mit CASSCF und CASPT2 die kritischen Strukturen, Energieminima und konischen Durchschneidungen sowie den Pfad minimaler Energie nach $S_2(\pi\pi^*)$ -Anregung [346]. Der doppelt angeregte $S(n^2\pi^{*2})$ -Zustand wurde als der von Schultz *et al.* mittels zeitaufgelöster Photoelektronenspektroskopie nachgewiesene $S_{3,4}$ -Zustand [329] identifiziert. Es wurde eine Reihe von konischen Durchschneidungen in der Nähe der Franck-Condon-Region von *trans*-AB gefunden, womit sich die unterschiedlichen

Isomerisierungsquantenausbeuten erklären lassen. Mit dem so verfeinerten Reaktionsmechanismus konnten alle wesentlichen experimentellen Befunde zu Azobenzol und sterisch gehinderten Azobenzolen inklusive der zeitaufgelösten Messungen erklärt werden.

Diau fand in CASSCF-Rechnungen entlang des Rotations-, Inversions- und konzertierten Inversionspfades ebenfalls die Deaktivierung des $S_1(n\pi^*)$ -Zustands über die Rotation [316]. Zwischen dem $S_2(\pi\pi^*)$ - und dem $S_1(n\pi^*)$ -Zustand wurde jedoch eine konische Durchschneidung bei nahezu linearer Geometrie gefunden. Daher wird zusätzlich zur Rotation auch die Möglichkeit einer konzertierten Inversion diskutiert. Allerdings wurden doppelt angeregte Zustände nicht berechnet, so dass der in den anderen Veröffentlichungen stark favorisierte Pfad nicht gefunden werden konnte.

Aber nicht nur CASSCF-Rechnungen stellen den Inversionsmechanismus infrage. Tiago *et al.* nutzen DFT und TD-DFT zur Berechnung zweidimensionaler Potentialenergieflächen von $S_1(n\pi^*)$ und S_0 [347]. Ciminelli *et al.* führten semiklassische Dynamiksimulationen mit der *semiklassischen Surface Hopping* Methode für Azobenzol im $S_2(\pi\pi^*)$ - und $S_1(n\pi^*)$ -Zustand für *cis* \rightarrow *trans* und *trans* \rightarrow *cis* durch und fanden nur den Rotationspfad [348]. Toniolo *et al.* verglichen *full multiple spawning* und *semiklassische SH* Methoden [349] und konnten die Ergebnisse bestätigen. Eine Übersicht über diese Simulationen findet sich in [350]. Auch semiklassische Dynamiksimulationen mit der *Semiclassical Electron-Radiation-Ion Dynamics* Methode, die für *cis*-AB von Sauer und Allen [351] sowie für *trans*-AB von Dou *et al.* [352] durchgeführt wurden, deuten auf die zentrale Rolle der Rotation als Isomerisierungsmechanismus und als Deaktivierungspfad des S_1 -Zustands hin. Für *trans*-AB zeigte sich in der Simulation allerdings, dass sich bei Rotation der CNN-Inversionswinkels vergrößert, was wiederum eine effiziente Rotation verhindert. Deshalb wird eine inversions-unterstützte Rotation als Reaktionskoordinate für *trans*-AB vorgeschlagen.

Crecca und Roitberg berechneten Potentialenergieflächen für reines Azobenzol und verschieden substituierte Derivate entlang der Koordinaten für Rotation, Inversion und konzertierte Inversion mit TD-DFT [353]. Es wurden ebenfalls keine Kreuzungen zwischen S_0 und S_1 entlang der Inversionskoordinate identifiziert. Die berechneten Energieflächen sprechen für eine Deaktivierung des direkt angeregten $S_1(n\pi^*)$ -Zustands über die Rotation, während die $S_2(\pi\pi^*)$ -Anregung zur schnellen Relaxation in den S_1 führt. Abhängig vom Substituenten kann das Molekül dann bei ausreichender Überschussenergie über die von Diau vorgeschlagene konzertierte Inversion oder nur entlang der Rotationskoordinate relaxieren. Außerdem wurde der Einfluss der Substituenten an den Phenylringen auf die thermische Isomerisierung im Grundzustand untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Grundzustandsbarriere für die Inversion durch elektronenschiebende Gruppen vergrößert und durch elektronenziehende Gruppen verkleinert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- Das von Monti *et al.* vorgeschlagene Modell – Relaxation aus dem S_2 über Rotation bzw. aus dem S_1 über Inversion – war lange Zeit weitgehend akzeptiert und konnte zunächst alle beobachteten Effekte der Azobenzol-Photochemie erklären. Später durchgeführte zeitaufgelöste Messungen standen damit im Einklang und auch

Untersuchungen modifizierter, sterisch eingeschränkter Azobenzole unterstützen diesen Mechanismus.

- Der überwiegende Anteil der experimentellen Arbeiten und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen sind im Einklang mit dem von Conti *et al.* etablierten Reaktionsmodell. Diese können es jedoch aufgrund der nicht vorhandenen Struktursensitivität weder direkt verifizieren noch falsifizieren.
- Die mit modifizierten Azobenzolen durchgeführten Experimente sind insofern ebenfalls kritisch zu betrachten. Denn neben der sterischen Einschränkung sind stets weitere Einflüsse auf die elektronische Struktur und die damit verbundene Änderung der Potentialflächen und Reaktionspfade zu berücksichtigen.
- Experimentelle Arbeiten konnten mittlerweile die Existenz und Bedeutung energetisch dicht liegender, höher angeregter Zustände ($S_{3,4}$) nachweisen. Diese wurden nach neueren quantenschemischen Rechnungen doppelt angeregten Singulettzuständen ($S(n^2\pi^{*2})$) zugeordnet, welche bei Monti *et al.* und in anderen, früheren theoretischen Arbeiten unberücksichtigt blieben.
- Neuere Rechnungen mit unterschiedlichen Methoden postulieren nun ein anderes Reaktionsmodell: Isomerisierung über Rotation im S_1 und schnelle $S_2 \rightarrow S_1$ Relaxation über den kreuzenden, doppelt angeregten $S(n^2\pi^{*2})$ -Zustand. Damit lassen sich ebenfalls alle bis dato bekannten experimentellen Befunde erklären.
- Die thermisch getriebene *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung im Grundzustand erfolgt über Inversion, dabei hängt die Aktivierungsenergie und somit die Rate von den vorhandenen Substituenten an den Phenylringen ab.

Eigenschaften substituierter Azobenzole

Wie bereits in den vorigen Abschnitten gezeigt wurde, beeinflussen Substituenten an den Phenylringen über ihre elektronischen und sterischen Eigenschaften die Photochemie ganz wesentlich. Dabei werden die Derivate typischerweise in drei Klassen eingeteilt, die sich in spektralen und photochemischen Eigenschaften unterscheiden [27, 295, 354]:

Azobenzol-Typen entsprechen in ihren Eigenschaften dem unsubstituierten Azobenzol.

Das UV/vis Spektrum setzt sich aus der schwachen $S_1(n\pi^*)$ -Bande im Sichtbaren und der deutlich getrennten und größeren $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande im UV zusammen. Das Spektrum zeigt nur eine geringe Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels und die Substanzen fluoreszieren nicht oder nur sehr schwach. Die Zeitkonstanten für die thermische *cis* \rightarrow *trans* Rückreaktion bei Raumtemperatur liegen im Bereich von Stunden.

Aminoazobenzol-Typen besitzen elektronenschiebende Gruppen an *ortho*- oder *para*-Position (z. B. Aminogruppen, NH_2). Diese führen zu einer Rotverschiebung der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande, so dass sie mit der $S_1(n\pi^*)$ -Bande im sichtbaren überlagert. Die

genaue Lage der Banden ist von der Lösungsmittelpolarität abhängig. Aminoazobenzol-Typen können fluoreszieren und ihre thermische Rückreaktion findet typischerweise auf Minutenzeitskala statt.

Pseudostilben-Typen besitzen jeweils einen elektronenziehenden und -schiebenden Substituenten in der *para*-Position. Damit weisen sie eine stark asymmetrische Elektronenverteilung auf (engl.: *Push/Pull System*), was zu einer so starken Rotverschiebung der $\pi\pi^*$ -Bande führt, dass $\pi\pi^*$ - und $n\pi^*$ -Übergang die Reihenfolge tauschen können. Auch hier gibt es aufgrund des Ladungstransfer-Charakters eine ausgeprägte Abhängigkeit des Spektrums von der Polarität des Lösungsmittels. Einige der Pseudostilbene fluoreszieren. Sie zeigen nach *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung eine schnelle thermische Rückreaktion im Sekundenbereich, was auf eine vergleichsweise geringe Energiebarriere im Grundzustand zwischen beiden Konfigurationen hinweist. Auf diese Weise ermöglichen sie ein effizientes, häufiges Schalten zwischen beiden Isomeren. Die asymmetrische Ladungsverteilung führt darüber hinaus zu interessanten optisch nicht-linearen Eigenschaften. Pseudo-Stilbene besitzen eine rote Farbe und zu dieser Klasse gehören die meisten kommerziell erhältlichen Azofarbstoffe.

Allen Typen gemein ist ihre reine, schnelle und effiziente Photochemie: Nach Photoanregung relaxieren sie nahezu ausschließlich über interne Konversion entweder in den ursprünglichen Grundzustand oder in das Isomer, Nebenreaktionen oder Photobleichen sind also allgemein vernachlässigbar. Die Lebensdauern der angeregten Zustände, die Isomerisierungsquantenausbeuten und die thermische *cis* \rightarrow *trans*-Reaktionsrate werden im Wesentlichen durch die elektronischen und sterischen Eigenschaften der Substituenten beeinflusst. Damit lassen sich gewissermaßen *maßgeschneiderte* Azobenzolschalter für alle möglichen Anwendungen synthetisieren. Im folgenden Abschnitt wird auf die Verwendung von Azobenzolschaltern zur Aufklärung der Konformationsdynamik von Peptiden und die dafür notwendigen Designkriterien eingegangen.

6.2.4 Vorüberlegungen zu Anreg-/Abtastexperimenten mit Azopeptiden

Schon in der Einleitung wurde eine ganze Reihe unterschiedlichster Anwendungen von Photoschaltern aufgezählt. In dieser Zusammenstellung wird deutlich, wie diversifiziert die Familie der Azobenzolderivate ist. Ebenso vielfältig wie die Anwendungen sind die Möglichkeiten verschiedene Eigenschaften zu optimieren. Beispielsweise kommt es für optische Speichermedien offensichtlich auf eine hohe thermische Stabilität der Isomere an [37], während für die lichtgetriebene Ausrichtung von Farbstoffen, z. B. zur Erzeugung optischer Anisotropien, genau das Gegenteil gewünscht ist [41].

Selbst innerhalb derselben Anwendung als Konformationsschalter lässt sich die Stabilität in weiten Bereichen modulieren: Pozhidaeva *et al.* konnten photoschaltbare Peptide mit seitenkettenverbrückten Azobenzolschaltern herstellen, wobei die thermische Stabilität des *cis*-Isomers von den Substituenten abhängt. Die Halbwertszeiten liegen im Bereich

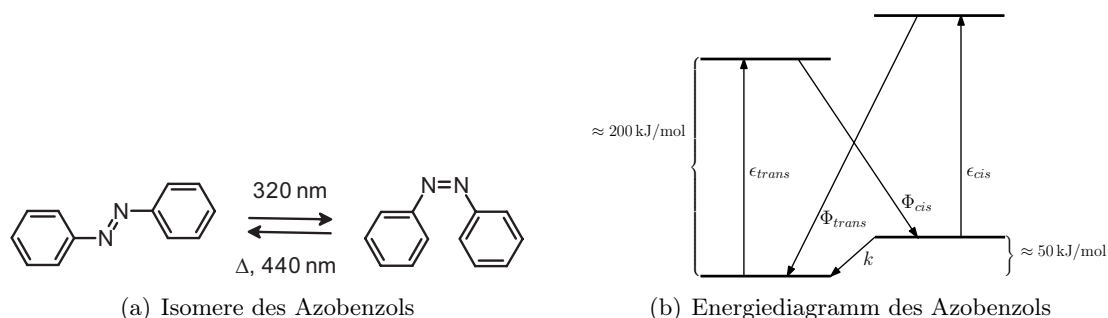


Abbildung 6.3: Vereinfachtes Strukturmodell des Azobenzols und zugehöriges Energieniveaudiagramm mit den wichtigsten Übergangsraten (aus: [27])

von 11 s bis 43 h [355]. Die Wahl der Substituenten beeinflusst neben der thermischen Stabilität der Isomere im Grundzustand vor allem die spektralen Eigenschaften [356].

Daher stellt sich die Frage, welchen Anforderungen die Kombination aus Schalter und Peptid für die hier geplanten Arbeiten genügen muss, bzw. welche Eigenschaften zu optimieren sind. Die große Geometrieänderung nach der ultraschnellen *cis* → *trans*- (oder *trans* → *cis*-) Isomerisierung des Photoschalters erzwingt eine neue Gleichgewichtskonformation des Peptids. Die molekularen Bewegungen beim Einnehmen dieser neuen Konformation sollen dann spektroskopisch mit hoher Zeitauflösung verfolgt werden. Für eine eindeutige Zuordnung der Signale sollte – soweit möglich – entweder nur das *trans*- oder nur das *cis*-Isomer angeregt werden.

Im Allgemeinen lässt sich das thermodynamisch stabilere *trans*-Isomer eines Azobenzolderivates durch thermische Relaxation im Dunkeln erhalten und das *cis*-Isomer kann durch Belichtung hergestellt und dann chromatographisch abgetrennt werden. Beide Möglichkeiten sind jedoch für die Ultrakurzzeitmessungen ungeeignet, da im Verlauf der Messung durch das Anregungslicht allmählich das jeweils andere Isomer akkumuliert wird. Ist die Messdauer groß und die Probenmenge klein kann es zu signifikanten Änderungen der Konzentrationen kommen.

Eine bessere Möglichkeit ist die Herstellung eines stationären Gleichgewichtszustands, wobei die Störung des Gleichgewichtes durch das Messlicht vernachlässigt werden kann. Aufgrund der Unterschiede im Absorptionsspektrum bietet sich die Dauerbelichtung mit geeigneter Wellenlänge an, um eine stationäre Mischung mit erhöhtem *cis*- oder *trans*-AB Anteil zu erhalten – man spricht hierbei von einem photostationärem Gleichgewicht. In Abbildung 6.3 wird dieser Zusammenhang verdeutlicht.

Auf der Basis dieses Reaktionsmodells kann man folgende Vereinfachungen annehmen: Die Anzahl der Moleküle im angeregten Zustand, die thermische *trans* → *cis*-Isomerisierung und alle übrigen Reaktionen außer der Isomerisierung werden vernachlässigt. Analog zum Massenwirkungsgesetz kann man nun für kontinuierliche Bestrahlung mit der Wellenlänge λ den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen von *trans*-AB [AB_{trans}]

und *cis*-AB $[AB_{cis}]$ für die Elementarreaktionen abschätzen:

$$\begin{aligned}\frac{d[AB_{cis}]}{dt} &= [AB_{cis}] \epsilon_{cis} \Phi_{trans} + k_{\Delta} [AB_{cis}] \\ \frac{d[AB_{trans}]}{dt} &= [AB_{trans}] \epsilon_{trans} \Phi_{cis}\end{aligned}\quad (6.1)$$

Dabei ist ϵ_{cis} der Extinktionskoeffizient bei der verwendeten Wellenlänge, Φ_{trans} die Isomerisierungsquantenausbeute und k_{Δ} die thermische Isomerisierungsrate von *cis*-AB. Für *trans*-AB ist die Bezeichnung analog.

Im Gleichgewicht sind die Konzentrationen zeitunabhängig, somit können die Reaktionsgeschwindigkeiten für beide Richtungen gleichgesetzt werden. Bei ausreichend hoher Beleuchtungsstärke kann man zusätzlich die thermische Relaxationrate k_{Δ} vernachlässigen und die erreichbaren Konzentrationsverhältnisse lassen sich direkt aus den Absorptionsspektren abschätzen. Bei ausreichender Beleuchtungsstärke ist dies gegeben (vg. Abb. 6.10 auf S. 167). Man erhält für die Konzentrationen im photostationären Gleichgewicht:

$$\frac{[AB_{trans}]}{[AB_{cis}]} = \frac{\epsilon_{cis} \Phi_{trans}}{\epsilon_{trans} \Phi_{cis}} \quad (6.2)$$

Da es keine Bereiche gibt in denen nur eines der Isomere absorbiert, ist es nicht möglich auf diese Art eine isomerenreine Lösung herzustellen, typische Werte liegen zwischen 70 % und 90 %. Ebenso ist bei der Messung davon auszugehen, dass je nach erreichtem Konzentrationsverhältnis in transienten Spektren teilweise erhebliche Signalanteile auf das unerwünschte Isomer zurückzuführen sind. Insofern bedeutet *cis*-AB *überwiegend cis*-AB und *trans*-AB *überwiegend trans*-AB.

Erste Ansätze in der Arbeitsgruppe von Prof. Moroder basierten auf dem Photoschalter APB, der in zyklische Peptide integriert wurde [357]. Die starre Struktur des Chromophors ermöglichte die effiziente Kopplung von Schalterkonfiguration und Peptidkonformation [358]. Ultraschnelle Isomerisierung konnte für den in zyklische wie lineare Peptide integrierten Schalter [278, 359] ebenso gezeigt werden wie zuvor für das isolierte APB-Molekül [277]. APB besitzt allerdings einen starken Push/Pull-Effekt und gehört somit zur Gruppe der Pseudostilbene. Die spektrale Überlappung von $S_2(\pi\pi^*)$ - und $S_1(n\pi^*)$ -Bande [131, 277] beider Konfigurationen hat zur Folge, dass stets beide Zustände angeregt werden und außerdem *trans*- und *cis*-Isomer spektral nicht eindeutig zu trennen sind. Es ist also nicht möglich im photostationären Gleichgewicht große Populationsunterschiede zwischen den Isomeren zu erzeugen oder durch Wahl einer geeigneten Anregungswellenlänge nur eines der Isomere anzuregen. Beim Einbau ins Peptid erstreckt sich das delokalisierte π -Elektronensystem der Azobenzoleinheit noch über die angrenzenden Peptidbindungen hinaus, was zu einer Abnahme der Rotverschiebung im Vergleich zum isolierten Schalter führt. Folglich lässt sich APB als Konformationsschalter in Peptiden einsetzen, allerdings ist ein direkter Vergleich von isoliertem und eingebautem Schalter hier nicht möglich.

Besser geeignet ist das Derivat AMPB, bei dem eine Methylengruppe zwischen Phenyl- und Aminogruppe das konjugierte π -System unterbricht [279]. Mit nur gering verschobenen Absorptionsbanden gehört AMPB zur Gruppe der Azobenzol-Typen, was die

Charakterisierung des isolierten Chromophors im photostationären Gleichgewicht und damit den direkten Vergleich zu AMPB-Peptiden erlaubt [131]. Andererseits sind die sterischen Einschränkungen für AMPB-Peptide weniger stark, was zu etwas mehr Flexibilität und konformationeller Freiheit führt [360]. AMPB wurde zur Konformationskontrolle der wasserlöslichen zyklischen Peptide eingesetzt, die hier jedoch nicht weiter vorgestellt werden (vgl. S. 142).

Für die Experimente zur lichtgesteuerten Entfaltung eines Modellkollagens wurde von Ulrike Kusebauch während ihrer Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. L. Moroder ein neuartiger Azoschalter entwickelt. Dieser wird in Abschnitt 6.5 ab S. 164 vorgestellt und hinsichtlich seiner spektroskopischen und thermischen Eigenschaften charakterisiert.

Immer wieder behauptete Unwahrheiten
werden nicht zu Wahrheiten, sondern
was schlimmer ist, zu Gewohnheiten.

(Oliver Hassenkamp)

6.3 Einführung in das photoschaltbare Collagen-Modellpeptid

Collagen ist das bei Wirbeltieren am häufigsten vorkommende Protein, es ist z. B. in Bindegewebe, Zähnen, Sehnen, Bändern, Knochen, Knorpeln und der Haut vorhanden und kann bis zu einem Drittel der Gesamtmasse an Proteinen ausmachen. In den letzten Jahren sind Collagene Gegenstand intensiver Forschung. Neben der reinen Strukturaufklärung stellte sich dabei insbesondere die Frage nach ihrer besonderen Stabilität und Flexibilität. Für eine Einführung und Übersicht ihrer charakteristischen Eigenschaften sei auf die Reviewartikel von Brodsky und Persikov [361], Jenkins und Raines [362] sowie Berisio *et al.* [363] verwiesen, im Folgenden werden nur die wichtigsten zusammengefasst.

Die Tertiärstruktur der Collagene ist einzigartig: drei parallele, linkshändige, Polyprolin-II-ähnliche Helices winden sich um eine gemeinsame Achse und bilden eine rechtshändige Superhelix, die Tripelhelix. Dieses Motiv erfordert eine charakteristische Primärstruktur der Einzelstränge, die zwingend an jeder dritten Position ein Glycin (Gly) enthält. Dieses zeigt ins Innere der Superhelix und ermöglicht so erst die dichte Packung der Aminosäuren. Die Peptide bestehen also aus der Wiederholung der Sequenz (Gly-Xaa-Yaa), dabei steht Gly für Glycin und Xaa und Yaa für die Aminosäuren in der X- bzw. Y-Position des Triplets, die zu einem großen Anteil aus Iminosäuren bestehen [361].

Die Bausteine Xaa und Yaa stabilisieren die Gesamtstruktur über interne Wasserstoffbrückenbindungen sowie Wechselwirkungen der Seitenketten und ermöglichen die Bindung von Rezeptoren, Liganden, Proteinen sowie die Vernetzung mit anderen Tripelhelices. Bei Wirbeltieren sind nahezu ausschließlich L-Prolin (*Pro*) in der X- und 4(R)-Hydroxy-L-Prolin (*Hyp*) in der Y-Position anzutreffen. Die drei Einzelstränge sind in der Superhelix jeweils um eine Aminosäure versetzt angeordnet, so dass sich für das Triplet (Gly-Pro-Hyp) die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen jeweils zwischen der Aminogruppe des Glycins und der Carbonylgruppe des Prolins ausbilden.

Abbildung 6.4 zeigt verschiedene Ansichten einer solchen Tripelhelix. In der vereinfachten Darstellung des Peptid-Rückgrats wird deutlich, wie sich drei linkshändige Einzelhelices zur rechtshändigen Collagen-Tripelhelix zusammenfügen. Deren Kompaktheit erkennt man in der Stäbchendarstellung der Vorder- und Seitenansicht, wobei hier die Wasserstoffatome der Übersichtlichkeit wegen weggelassen wurden. Die Superhelix wird durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carbonylgruppen der Proline und den Aminogruppen der Glycine stabilisiert, diese sind in der Seitenansicht als getrichelte Linien eingefügt.

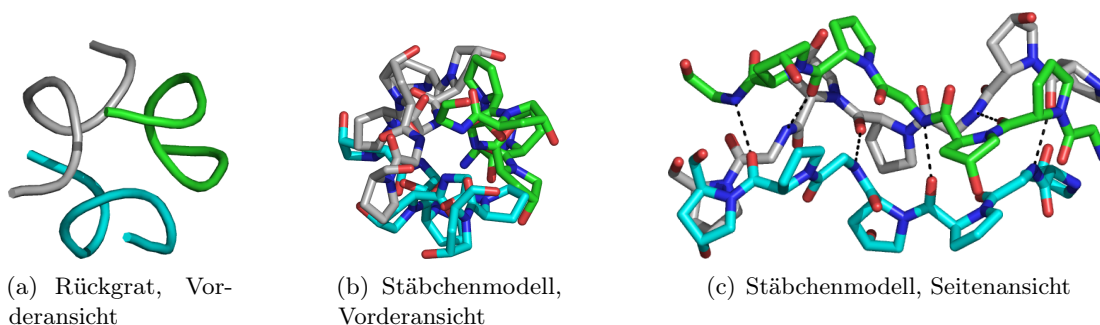


Abbildung 6.4: Vorder- und Seitenansichten einer synthetischen, homotrimeren Collagen-Tripelhelix mit der sich wiederholenden Sequenz $(\text{Pro-Hyp-Gly})_n$ [364]. Gezeigt ist ein Ausschnitt von jeweils sieben Aminosäuren. Die Kohlenstoffatome der drei Monomere sind in grau, cyan und grün dargestellt, Stickstoffatome in blau und Sauerstoffatome in rot. Wasserstoffatome werden nicht gezeigt, jedoch sind die Wasserstoffbrückenbindungen in der Seitenansicht (c) als gestrichelte Linien eingefügt. Die Strukturdaten wurden der Proteindatenbank [365, 366] entnommen: www.pdb.org, PDB ID: 1V6Q

Typischerweise schließen sich Collagene zu Fibrillen zusammen, welche sich wiederum zu größeren Einheiten anordnen und untereinander vernetzen können. Das erklärt die besondere Festigkeit und Flexibilität des Bindegewebes und die Fähigkeit je nach Vernetzung Kräften in einer, zwei oder drei Dimensionen zu widerstehen. Trotz des relativ einfachen Aufbaus der Primärsequenz zeigt sich also, dass die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Sequenz, Stabilität, Struktur und Funktion eine hochkomplexe Aufgabe ist, die sich mit natürlichen Collagenen in voller Größe kaum untersuchen lässt. Ein sehr erfolgreicher Ansatz ist die Arbeit mit synthetischen Peptidsequenzen, welche bereits die charakteristische Superhelix ausbilden. Diese können als Modellsystem dienen, sind aber dennoch klein genug um eine detaillierte Analyse bestimmter Aspekte zu erlauben. So lassen sich die Auswirkungen von Modifikationen der Sequenz auf Struktur und Stabilität direkt beobachten. Mittels hochaufgelöster Röntgenstrukturanalyse können z. B. die Hydratisierung der einzelnen Aminosäuren und ihre Wechselwirkungen untereinander untersucht werden. Bei bekannter Struktur ergeben sich interessante Anknüpfungspunkte für die Aufklärung weiterer Aspekte mit Hilfe von Molekulardynamiksimulationen oder quantenchemischen Rechnungen.

Durch den Zusammenhang zwischen der räumlichen Struktur und der Funktion eines Proteins ergibt sich stets die Frage nach dem zugrundeliegenden Faltungsmechanismus. Für Collagen wurde ein Reißverschlussähnlicher Bildungsmechanismus der Tripelhelix vorgeschlagen. Dieser setzt ein, sobald sich die Einzelstränge am C-Terminus richtig aneinandergelagert haben [367].

Eine besondere Rolle spielen dabei das Prolin und seine Derivate. Wegen des freien Elektronenpaars am Stickstoffatom besitzen die C–N-Bindungen aller Peptidbindungen einen partiellen Doppelbindungscharakter. Aufgrund der gehinderten Rotation um diese Achse lassen sich die zwei Konfigurationsisomere *cis* und *trans* bzw. *Z* und *E* unterscheiden. Dabei ist aus sterischen und elektronischen Gründen im Allgemeinen die

trans-Konfiguration stark bevorzugt. Die Energieunterschiede der beiden Konfigurationen beruhen wesentlich auf den direkt benachbarten Atomen des Stickstoffs. Ausnahmen stellen diejenigen Peptidbindungen dar, bei denen eine beliebige Aminosäure mit einem N-terminalen Prolin verknüpft ist. Hier ist das Stickstoffatom zusätzlich an ein weiteres Kohlenstoffatom des Prolin-Ringes gebunden (vgl. Abb. 6.28, S. 213). Deshalb sind die Energieunterschiede zwischen beiden Konfigurationen wesentlich geringer als bei allen anderen, natürlichen Aminosäuren und das *trans*-Isomer ist nur schwach bevorzugt. Bei Lösungen von künstlichen Oligopeptiden treten entsprechend Mischungen beider Konfigurationen auf. Der Übergang zwischen beiden Isomeren ist bei Raumtemperatur jedoch kinetisch gehemmt, die Aktivierungsenergie liegt bei etwa 85 kJ/mol [368, 369].

Da nur das *trans*-Isomer des Prolins die Bildung einer Tripelhelix zulässt, ist die Zeitskala der *cis* → *trans*-Isomerisierung des Prolins der entscheidende Faktor bei der Faltung künstlicher Modellcollagene. Untersuchungen von Systemen, die nur Peptidbindungen in *trans*-Konfiguration enthalten, zeigen sehr schnelle Faltungsreaktionen [370].

Um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären und einen Einblick in die Dynamik der einzelnen Peptidbindungen zu bekommen, bietet es sich an, den Faltungsvorgang mit zeitaufgelöster Spektroskopie direkt zu beobachten. Allgemein erfordert diese Methode die synchronisierte Auslösung der Faltungsreaktion aller im Beobachtungsvolumen befindlichen Peptide und somit eine Störung des Systems, die die gewünschte Reaktion bei einer ausreichenden Anzahl von Molekülen induziert. Untersuchungen der Collagenfaltung mittels Stopped-Flow-Messungen ergaben, dass die schnellsten Prozesse auf Zeitskalen im Mikrosekundenbereich und darunter ablaufen [370] – sofern alle Proline in *trans*-Konfiguration vorliegen. Will man auch noch diese sehr schnellen Kinetiken beobachten, so ist eine effiziente Störung des Gleichgewichtes auf noch kürzeren Zeiten erforderlich. Gut geeignet hierfür sind laserinduzierte Prozesse, bei denen es nach Absorption eines kurzen Laserpulses zur schnellen Änderung der Temperatur (T-Sprung Experimente, [59]), des pH-Wertes (Photosäuren) oder der Konzentration anderer Substanzen mit photolabilen Schutzgruppen kommt (*caged compounds* [166–168, 371], siehe auch Kapitel 4), typischerweise liegt die Zeitauflösung dieser Experimente im Bereich einiger Nanosekunden.

Um die Entfaltung eines Collagens mit noch höherer Zeitauflösung messen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. L. Moroder ein anderer Ansatz gewählt. Es wurde ein synthetisches collagenartiges Peptid hergestellt, dessen Einzelstränge über eine Klammer aus einem Azobenzolderivat verfügen, welches als ultraschneller Konformationsschalter fungiert. Die charakteristische Sequenz der Monomere ist (Gly-Pro-Hyp), wobei zur Ankopplung des Azobenzolschalters zwei Proline durch Mercaptoproline substituiert wurden. Details zur Synthese finden sich in [372–374]. Die Primärstruktur wurde so ausgewählt, dass eine stabile Tripelhelix besteht, falls die Azobenzolschalter aller Einzelstränge im thermisch stabileren *trans*-Zustand vorliegen. Die lichtinduzierte *trans* → *cis*-Isomerisierung eines einzigen Schalters soll eine Störung der Konformation erzeugen, die eine Entfaltung der Collagenhelix auslöst. Dieser Vorgang wird in Abb. 6.5 anschaulich dargestellt. Die Strukturen der Azoschalter und der Einzelstränge finden sich in Abbildung 6.6. Mit NMR-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass die Konfigura-

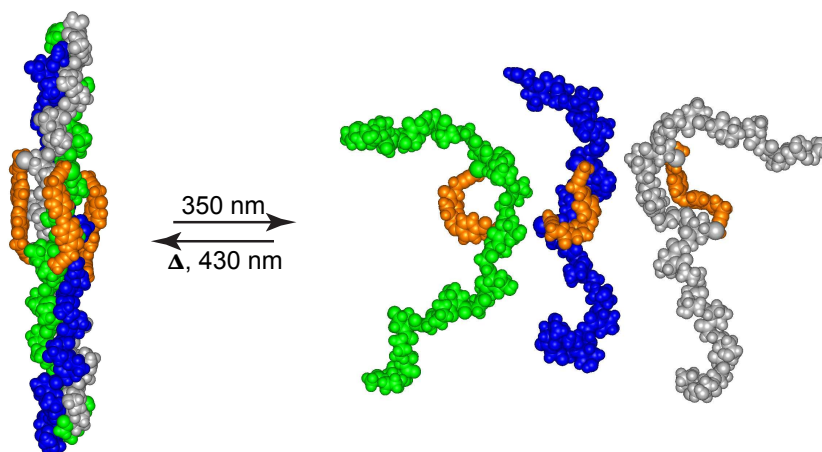


Abbildung 6.5: Illustration der Entfaltung des synthetischen Collagens nach *trans* → *cis*-Isomerisierung des Azoschalters. Die drei Einzelstränge sind in grün, blau und grau dargestellt, das Azobenzolderivat in orange. Dieses Ergebnis einer molekularen Modellierung wurde freundlicherweise von Prof. L. Moroder zur Verfügung gestellt.

tionsänderung des Azobenzols zu einem höheren Anteil an Monomeren führt. Außerdem zeigen sich charakteristische Signale in CD- und FTIR-Differenzspektren, die als Hinweis auf eine lichtinduzierte Entfaltung gedeutet wurden [373].

In dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Ultrakurzzeitspektroskopie im infraroten Spektralbereich die ersten Schritte bei der Entfaltungsreaktion untersucht werden. Dabei sollen Änderungen der Konformation des Peptidrückgrats sowie das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen identifiziert werden. Um die Dynamik des Modellcollagens zu verstehen und von den Signalen des Azoschalters unterscheiden zu können, muss dieser zunächst ebenfalls vollständig charakterisiert werden. Umfangreiche Untersuchungen sowohl des Azobenzolschalters als auch des gekoppelten Systems wurden bereits von

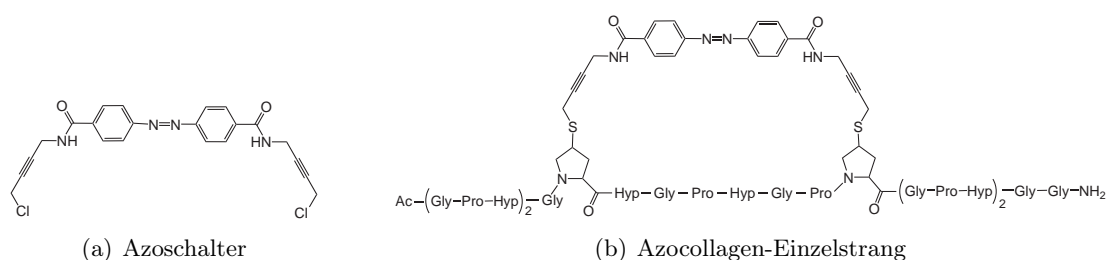


Abbildung 6.6: Strukturen des isolierten Azoschalters (a) und eines Einzelstrangs des Azocollagens (b). Der Azoschalter besitzt terminale Chlorgruppen, diese wurden für die Kopplung an das Peptid zunächst gegen das reaktivere Jod ausgetauscht. Details zur Synthese finden sich in [372, 374]. Es werden folgende Abkürzungen verwendet: Ac – Acetylgruppe, Gly – Glycin, Pro – Prolin, Hyp – Hydroxyprolin. Wasserstoffatome werden nicht dargestellt.

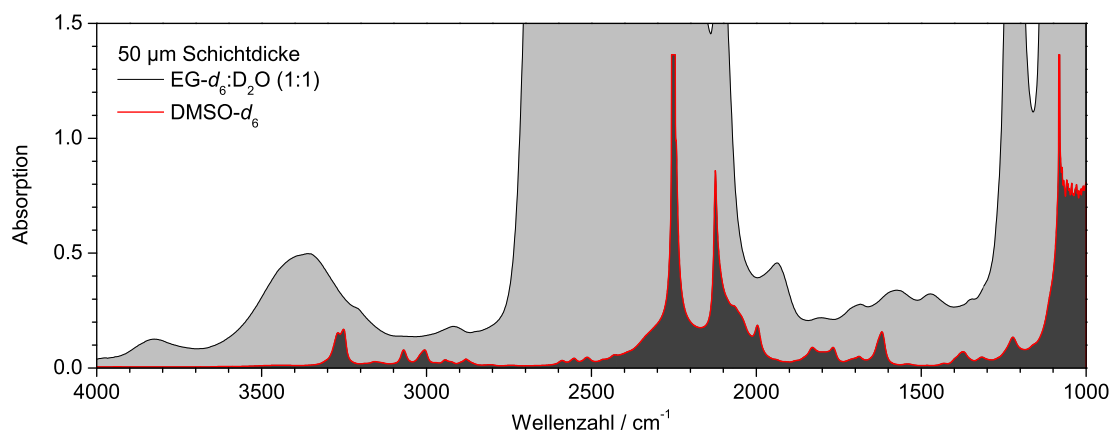


Abbildung 6.7: Infrarotspektren der verwendeten Lösungsmittel: die Messung von EG- d_6 :D $_2$ O erfolgte unter denselben Bedingungen wie die in Abschnitt 6.6.2 vorgestellten FTIR Messungen. Das Spektrum von DMSO- d_6 wurde mit einer Schichtdicke von 220 μm aufgenommen und zum Vergleich entsprechend skaliert, daher sind größere Absorptionswerte als ca. 0,7 künstlich. Die Daten für DMSO- d_6 wurden freundlicherweise von Tobias E. Schrader, LMU München zur Verfügung gestellt.

L. Lorenz im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt [375]. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die gemessenen zeitaufgelösten Infrarotspektren können mit der bisherigen Interpretation bzw. dem bisherigen Reaktionsmodell jedoch nicht zufriedenstellend erklärt werden. Deshalb wurden die stationären Spektren des Azocollagens im UV/vis- und IR-Bereich einer erneuten detaillierten Auswertung unterzogen – insbesondere hinsichtlich ihrer Temperaturabhängigkeit.

Aufgrund der dabei erhaltenen neuen Erkenntnisse wurde die Bandenzuordnung im infraroten Spektralbereich vervollständigt bzw. verfeinert und schließlich die Interpretation der Signale in Bezug auf das Schmelzen der Collagentripelhelix korrigiert. Zunächst werden die Voruntersuchungen und die Ergebnisse der fs-Infrarotmessungen für den Azoschalter präsentiert und interpretiert und anschließend für das Azocollagen.

6.4 Lösungsmittel

Für einen direkten Vergleich von Azoschalter und Azocollagen müssten die Untersuchungen unter identischen Bedingungen erfolgen, insbesondere in demselben Lösungsmittel. Das ist jedoch nicht möglich: Zur Bildung der tripelhelikalen Struktur des Azocollagens werden Lösungsmittelgemische aus Wasser und Alkoholen verwendet. Das für die NMR-Untersuchung verwendete Gemisch aus deuteriertem Methanol und 0,1 M Essigsäure (4:1) [373] ist für die Infrarotspektroskopie aufgrund des niedrig siedenden Methanols allerdings ungeeignet. Daher wurde für die zeitaufgelösten und statischen Untersuchungen des Azocollagens ein Gemisch aus deuteriertem Ethylenglykol und D $_2$ O (EG- d_6 :D $_2$ O) im

Verhältnis 1:1 benutzt. Bei der Verwendung dieser deuterierten Lösungsmittel ist der in Abschnitt 2.3.2 (S. 9) beschriebene H/D-Austausch zu beachten.

Der isolierte Schalter lässt sich in EG- d_6 :D₂O nicht in ausreichend hoher Konzentration lösen, er kann also nicht unter denselben Bedingungen gemessen werden. Für die Charakterisierung des Azoschalters wurde daher deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO- d_6) eingesetzt. Dies war auch bei den vorhergehenden Infrarotexperimenten der Fall [373, 375]. Ein H/D-Austausch erfolgt hier nicht, da es sich bei DMSO um ein aprotisches Lösungsmittel handelt.

Abbildung 6.7 zeigt die Absorptionsspektren der verwendeten Lösungsmittel im Bereich von 3500 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} bei einer Schichtdicke von $50\text{ }\mu\text{m}$. Es lässt sich gut erkennen, dass der Spektralbereich von 1300 cm^{-1} bis 2000 cm^{-1} in beiden Fällen spektroskopisch zugänglich ist. Hier liegen charakteristische Absorptionsbanden vieler funktioneller Gruppen, insbesondere auch der struktursensitiven Amid I, Amid II und Amid III Schwingungsmoden der Peptidbindung.

Alle Lösungsmittel wurden von der Fa. Deutero (Kastellaun, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

6.5 Der Azoschalter

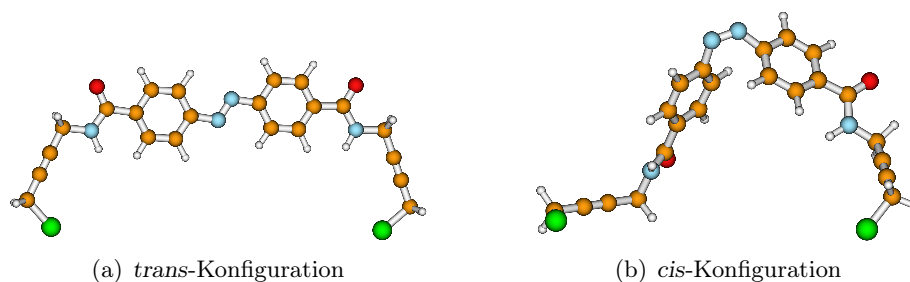


Abbildung 6.8: Kugelstabmodell der optimierten Strukturen des Azoschalters: die *trans*-Konfiguration ist nahezu planar, bei der *cis*-Konfiguration sind die Phenylringe gegeneinander verdreht wie beim Azobenzol. Die Atome sind farbkodiert: weiß: Wasserstoff, orange: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, grün: Chlor.

Das verwendete Azobenzolderivat wurde speziell für die Verwendung als Konformationsschalter des synthetischen Collagens entworfen und hergestellt. Kriterien waren zum einen die Länge der Azobenzolklammer für die Ankopplung an die Mercaptoproline der Peptideinzelstränge optimal anzupassen und zum anderen über eine relativ starre Struktur eine möglichst gute Kopplung der Peptidkonformation an die Konfiguration der Azo-Doppelbindung zu erreichen [373]. Der vorliegende isolierte Schalter besitzt terminale Chlor-Funktionen. Für die weitere Synthese des Azocollagens wurden diese zunächst gegen das reaktivere Jod ausgetauscht, um die Kopplung an die Mercaptoproline unter Abspaltung von HI zu ermöglichen.

Der Aufbau des Azoschalters ist symmetrisch, die direkten Substituenten an den *para*-Positionen der Phenylringe sind Carbonyl-Gruppen mit elektronenziehender Wirkung. Damit gehört dieses Azobenzol-Derivat gemäß der Klassifizierung auf Seite 154 zur Gruppe der Azobenzol-Typen. Diese Einteilung wird auch durch die Absorptionsspektren der Isomere bestätigt (Abb. 6.9(a)), die denen von reinem Azobenzol ähnlich sind.

Erwartungsgemäß ist das *trans*-Isomer thermisch stabiler und kann im Dunkeln zu 100 % erhalten werden. Die thermische Rückisomerisierung erfolgt bei Raumtemperatur auf der Zeitskala von Stunden [373].

Für beide Isomere wurden von PD M. Braun Geometrieoptimierungen und Frequenzanalysen auf DFT-Niveau mit BLYP Funktional und 6.31G* Basissatz durchgeführt (Abb. 6.8). Der Abstand der Kohlenstoffatome in den *para*-Positionen der Phenylringe beträgt danach in der *cis*-Konfiguration 6,7 Å und in der *trans*-Konfiguration 9,2 Å. Die Angabe weiterer Abstände ist hier nicht sinnvoll, da der Einfluss des Lösungsmittels nicht berechnet wurde und sich die Abstände durch leichte Änderungen der Bindungswinkel dramatisch ändern können. Die erhaltenen Strukturen zeigen, dass die Isomerisierung analog zum Azobenzol möglich ist und durch die Substituenten keine sterische Hinderung vorliegt. Allerdings ist aufgrund der großen Substituenten eine Verlängerung der Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands im Vergleich zu reinem Azobenzol zu erwarten (siehe Abschnitt 6.2.3). Das wurde durch Ultrakurzzeitspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich bestätigt [375].

6.5.1 Experimentelle Bedingungen

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Messungen des Azoschalters bei einer Konzentration von etwa 10 g/l (25 mM – 30 mM) in DMSO-*d*₆ aufgenommen. Diese hohe Konzentration ist für die Messungen im infraroten Spektralbereich erforderlich. Die Kontrollexperimente im UV/vis-Bereich wurden deshalb unter denselben Bedingungen durchgeführt.

Die UV/vis-Absorptionsspektren wurden mit einem Specord S 100 Spektrometer der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) gemessen. Dazu wurde dieselbe Küvette mit einer Schichtdicke von 50 µm eingesetzt, die auch für die zeitaufgelösten IR-Messungen benutzt wurde.

Die Absorptions- und Differenzspektren beider Isomere des Azoschalters im infraroten Spektralbereich wurden zuvor von L. Lorenz gemessen [375]. Konzentration und Schichtdicke der Probe sind vergleichbar, die Messung erfolgte in Transmission mit einem Vector 22 FTIR-Spektrometer der Firma Bruker und einer Küvette mit 50 µm Schichtdicke.

Die photostationären Gleichgewichtszustände wurden mit der in Abschnitt 3.1.4 vorgestellten Belichtungseinheit eingestellt. Für die Anreicherung des *cis*-Isomers wurde eine Kombination der Farbglasfilter WG320 und UG1 verwendet, was zur Selektion der Quecksilberlinie bei 365 nm führt. Die Präparation des *trans*-Zustands erfolgte durch Belichtung bei 436 nm mit einer Filterkombination aus GG420 und BG3. Die Spektren der Belichtungseinheit finden sich in Abbildung 3.9(b) auf Seite 45.

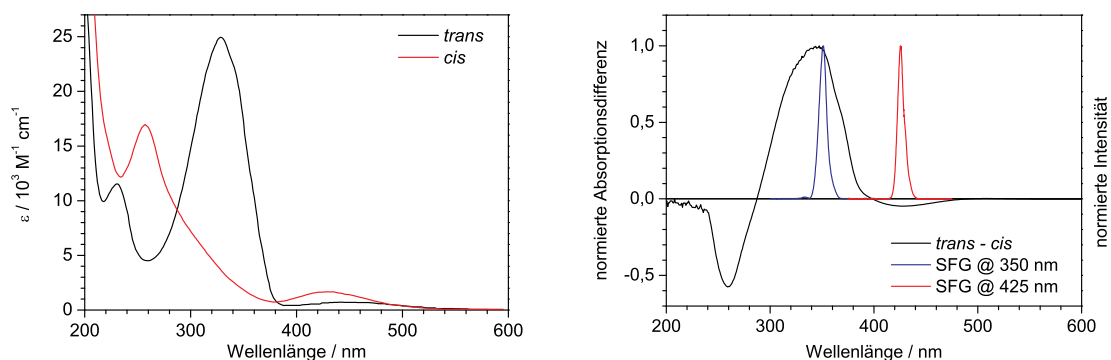
Zur Erzeugung des Anregungslichtes wurde die SFG verwendet. Für die Anregung des *trans*-Isomers wurde der NOPA auf eine Wellenlänge von 640 nm eingestellt, entsprechend einer SFG bei 350 nm. Für die Anregung des *cis*-Isomers wurde der NOPA im nahen Infrarot bei 940 nm betrieben, was zu SFG bei 425 nm führt. Die normierten Spektren der Anregungspulse sind ebenfalls in Abb. 6.9(b) eingezeichnet.

Für alle hier vorgestellten Datensätze war es nötig, Messungen bei verschiedenen, teilweise überlappenden Abtastwellenzahlbereichen durchzuführen. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit dieser Einzelmessungen untereinander zu gewährleisten, konnten keine Referenzspektren des reinen Lösungsmittels oder eines ZnSe-Substrats unter identischen Bedingungen aufgenommen werden: Denn dazu müsste der mit trockener Luft gespülte Bereich des Aufbaus geöffnet und die Probenzelle ausgetauscht werden. Der anschließend erforderliche Spülvorgang sowie die beim Öffnen des Kastens erzeugten (Temperatur-) Instabilitäten führen zu langen Verzögerungen und experimentellen Unwägbarkeiten. Ohne diese Daten kann die in den Einzelmessungen erreichte Zeitauflösung nicht exakt bestimmt werden. Messungen unter ähnlichen Bedingungen ergeben Kreuzkorrelationsbreiten von $\approx 0,4$ ps.

6.5.2 Spektrale Charakterisierung und Voruntersuchungen

Im Folgenden werden die Absorptions- und Differenzspektren im sichtbaren und infraroten Spektralbereich vorgestellt und die Bedingungen für die Einstellung eines photostationären Gleichgewichtes von *trans*- und *cis*-Isomer erläutert.

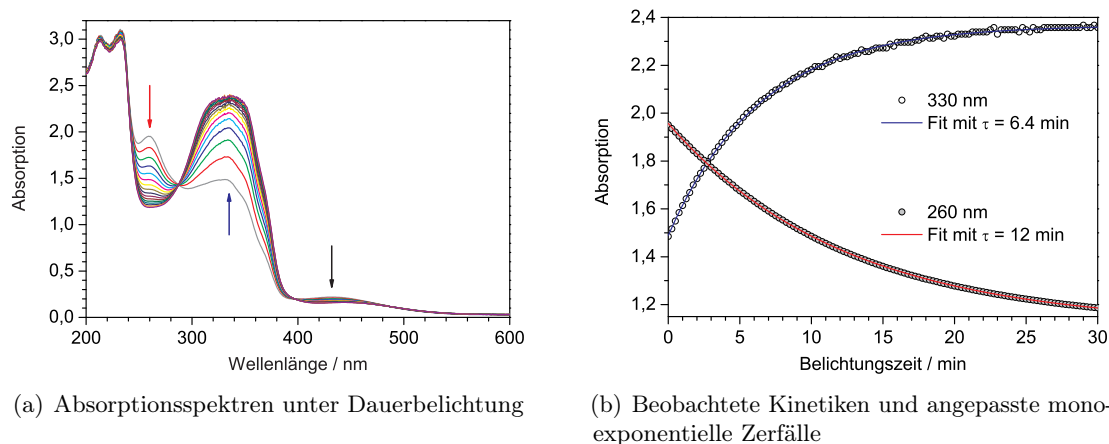
UV/vis-Absorptionsspektren



(a) Absorptionsspektren der reinen Isomere des Azoschalters im HPLC-Eluenten [374]

(b) *cis* → *trans*-Differenzspektrum in DMSO- d_6 und Anregungspulse

Abbildung 6.9: In (a) sind die Spektren der *trans*- und *cis*-Isomere des Azoschalters nach Trennung mittels analytischer HPLC aus [374] gezeigt. In (b) wird das *cis* → *trans*-Differenzspektrum der photostationären Gleichgewichte unter den Bedingungen für die transiente IR Spektroskopie zusammen mit den Spektren der verwendeten Anregungspulse dargestellt. Aufgrund der hohen Konzentrationen sind die gemessenen Absorptionsdifferenzen für $\lambda < 240$ nm artifiziell (vgl. Abb. 6.10(a)).



(a) Absorptionsspektren unter Dauerbelichtung

(b) Beobachtete Kinetiken und angepasste monoexponentielle Zerfälle

Abbildung 6.10: Einstellung des photostationären Gleichgewichtes mit Anreicherung des *trans*-Azoschalters. In (a) sind die Spektren im zeitlichen Abstand von 2 min gezeigt, in (b) die bei 260 nm und 330 nm beobachteten Kinetiken. Die für die IR-Messungen erforderliche hohe Konzentration führt zu Artefakten.

In Abb. 6.9(a) sind die Spektren des reinen *trans*- bzw. *cis*-Azoschalters gezeigt. Die Spektren wurden den im Internet veröffentlichten Hintergrundinformationen [374] der Referenz [373] entnommen. Die Auftrennung der beiden Isomere erfolgte dabei chromatographisch mittels HPLC nach der Präparation eines Isomerengemisches in DMSO durch Belichtung der *trans*-Form. Anschließend wurden die Spektren direkt im HPLC-Eluenten aufgenommen. Sie ähneln erwartungsgemäß denen von Azobenzol, die deutlich getrennten $n\pi^*$ - und $\pi\pi^*$ -Banden des *cis*- bzw. *trans*-Isomers erlauben die bevorzugte Anregung eines Isomers.

Das *cis* \rightarrow *trans*-Differenzspektrum (Abb. 6.9(b)) wurde unter den Bedingungen für die transiente IR-Differenzspektroskopie aufgenommen. Wegen der hohen Konzentration zeigt es im Bereich unter 240 nm unphysikalische Werte, die hohe Absorption verhindert dort eine zuverlässige Messung (vgl. Abb. 6.10(a)). Weitere Unterschiede im Vergleich zum Spektrum der aufgereinigten Isomere sind auf die unterschiedlichen Lösungsmittel beider Experimente zurückzuführen.

Photostationäre Gleichgewichte

Weil nur geringe Probenmengen zur Verfügung standen, konnte in den zeitaufgelösten Messungen nur die Rotationsküvette eingesetzt werden. Testmessungen bestätigten, dass bei diesem kleinen Probenvolumen die Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes durch das Anregungslicht nicht mehr vernachlässigbar ist. Diese Störung muss durch kontinuierliche Belichtung während der Messung kompensiert werden, so dass die Konzentrationen von *cis*- und *trans*-Isomer konstant bleiben.

Kann man die thermische Relaxation gegenüber der lichtinduzierten Reaktion vernachlässigen, wird die Lage des photostationären Gleichgewichtes durch die Isomerisie-

rungsquantenausbeute und die Extinktionskoeffizienten der Isomere bestimmt (Gleichung 6.2, S. 157). Eine weitere Steigerung der Beleuchtungsintensität bewirkt also keine Konzentrationsänderung mehr, jedoch steigt die Isomerisierungsrate und damit die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Nebenreaktionen. Besonders wichtig ist das für die Messungen am Azocollagen, da die *trans* → *cis*-Isomerisierung des Azoschalters eine Reaktion in einem komplexen System gekoppelter Gleichgewichte darstellt. Weitere Reaktionen sind die Entfaltung des Collagens zu den Monomeren und die *trans/cis*-Isomerisierung der Proline in den Monomeren. Die Bildung der Collagentripelhelix durch Selbstassoziation erfolgt nur, falls die Proline alle in *trans*-Konfiguration vorliegen. Entsprechend könnte bereits die Dauerstrichbelichtung zu einer deutlichen Verschiebung dieses Gleichgewichtes zugunsten der Monomere führen. Deshalb muss die Bestrahlung mit der geringst möglichen Intensität erfolgen, um die Degeneration der Probe durch die Dauerbelichtung zu vermeiden oder zumindest zu verringern.

Zunächst wurde bestimmt, mit welcher Beleuchtungsintensität die Einstellung und Erhaltung des photostationären Gleichgewichtes noch gewährleistet ist. Dazu wurde eine Probenküvette in den Strahlengang des UV/vis-Spektrometers eingebracht und mittels der Belichtungseinheit unter denselben Bedingungen wie in der Femtosekundenanlage beleuchtet. Die Einstellung des Gleichgewichtes konnte dann durch Aufzeichnung der Absorptionsspektren im zeitlichen Abstand von 15 s in Echtzeit beobachtet werden. Abbildung 6.10 zeigt die Präparation des *trans*-angereicherten Zustands unter den optimierten Bedingungen. Die UV-Intensität wurde dabei durch einen Neutralglasfilter (OD = 1,0) um 90 % abgeschwächt, der zusätzlich zu den Farbglasfiltern eingesetzt wurde.

Die Kurvenschar besitzt isosbestische Punkte bei 287 nm und 398 nm, was im Einklang mit der Annahme eines reinen Zwei-Zustands-Systems ist. Jedoch sind bei 212 nm und 232 nm zwei Maxima zu erkennen, die in den aus [374] entnommenen Spektren (Abb. 6.9(a)) nicht auftreten und die $S_2(\pi\pi^*)$ Bande der *trans*-angereicherten Lösung ist abgeflacht und verbreitert. Weiterhin unterscheiden sich die Kinetiken und die daraus ermittelten Zeitkonstanten abhängig von der Wellenlänge (Abb. 6.10(b)). Diese Diskrepanzen zwischen den Spektren sind nicht allein durch die ungenaue Bestimmung hoher Absorptionswerte zu erklären. Eine wahrscheinliche Erklärung ist, dass es bei den hier eingesetzten Konzentrationen zu Wechselwirkungen (z. B. $\pi - \pi$ -Stapel Effekte) zwischen den Chromophoren kommt. Unter diesen Bedingungen kann nicht mehr von der Gültigkeit des Lambert-Beerschen-Gesetzes ausgegangen werden, was die Bandenverbreiterung und die wellenlängenabhängige Kinetik ebenso erklärt wie die unterhalb von 240 nm auftretenden, zusätzlichen Absorptionsbanden.

Trotz all dieser Unsicherheiten kann selbst bei vorsichtiger Abschätzung angenommen werden, dass die Gleichgewichtseinstellung bei der verwendeten Belichtungseinheit mit einer Zeitkonstante von ca. 15 min erfolgt. Das reicht aus um den stationären Zustand vor der Messung zu erreichen und währenddessen zu erhalten.

Die UV/vis-Absorptionsspektren der photostationären Gleichgewichtszustände wurden bereits im Rahmen der Doktorarbeiten von U. Kusebauch [372] und L. Lorenz [375] untersucht und veröffentlicht. Die erreichten Konzentrationsverhältnisse lassen sich durch Vergleich mit den Spektren der reinen Isomere abschätzen. Das *trans*-Isomer kann stets

		$X_t/\%$	$X_c/\%$	λ/nm	$f_{ct}(\lambda)$	$f_{tc}(\lambda)$	$P_t/\%$	$P_c/\%$
<i>trans</i>	max	93	7	350	0,1	10	99	1
	min	87	13		0,125	8	98	2
<i>cis</i>	max	25	75	425	3	0,33	10	90
	min	30	70		2,5	0,4	15	85

Tabelle 6.2: Anregungswahrscheinlichkeit P_t für das *trans*- und P_c für das *cis*-Isomer bei den verwendeten Anregungswellenlängen λ für die photostationären Gleichgewichte. Es werden Maximal- und Minimalwerte abgeschätzt. Die Molenbrüche wurden aus den gemessenen stationären Spektren der Gleichgewichte [372, 375], die Verhältnisse der Extinktionskoeffizienten f_{ct} bzw. f_{tc} aus den Spektren der reinen Isomere (Abb. 6.9(a)) abgeschätzt. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit erfolgt nach Gleichung 6.3.

zu 100 % durch thermische Relaxation im Dunkeln isoliert werden. Bei Belichtung liegt dagegen die maximal erreichbare Konzentration von *trans* bei etwa 90 % und die von *cis* bei 70 % bis 75 %.

Durch die Anregungspulse wird also stets ein Gemisch aus *cis*- und *trans*-Molekülen angeregt und es stellt sich die Frage, zu welchen Anteilen die gemessenen transienten Absorptionsänderungen auf die einzelnen Isomere zurückzuführen sind. Neben den Konzentrationsverhältnissen sind die Extinktionskoeffizienten bei der Anregungswellenlänge zu beachten: Für die Absorption A gilt – zumindest bei geringen Konzentrationen – das Lambert-Beersche Gesetz, damit addieren sich die Absorptionen beider Komponenten:

$$\begin{aligned} A_{\text{ges}}(\lambda) &= A_t(\lambda) + A_c(\lambda) \\ &= \epsilon_t c_t d + \epsilon_c c_c d \end{aligned}$$

Mit dem Molenbruch $X_t = c_t/c_0$ des *trans*-Isomers, der Gesamtkonzentration c_0 und dem Verhältnis $f_{ct}(\lambda) = \epsilon_c(\lambda)/\epsilon_t(\lambda)$ der Extinktionskoeffizienten ergibt sich:

$$A_{\text{ges}}(\lambda) = [X_t + f_{ct}(1 - X_t)] c_0 d \epsilon_t(\lambda)$$

Die Wahrscheinlichkeit für die Anregung des *trans*-Isomers P_t entspricht der relativen Absorption, es folgt:

$$P_t = \frac{A_t}{A_{\text{ges}}} = \frac{X_t c_0 d \epsilon_t(\lambda)}{[X_t + f_{ct}(1 - X_t)] c_0 d \epsilon_t(\lambda)} = \frac{1}{1 + f_{ct} \left(\frac{1}{X_t} - 1 \right)} \quad (6.3)$$

Für die Molenbrüche werden die Konzentrationsverhältnisse der photostationären Gleichgewichte eingesetzt, die Extinktionskoeffizienten lassen sich aus den Absorptionsspektren der reinen Isomere bestimmen (Abb. 6.9(a), S. 166). Dabei ist zu beachten, dass diese nicht in DMSO- d_6 gemessen wurden und die Banden etwas verschoben sind. Deshalb werden obere und untere Schranken abgeschätzt, die angenommenen Werte und Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

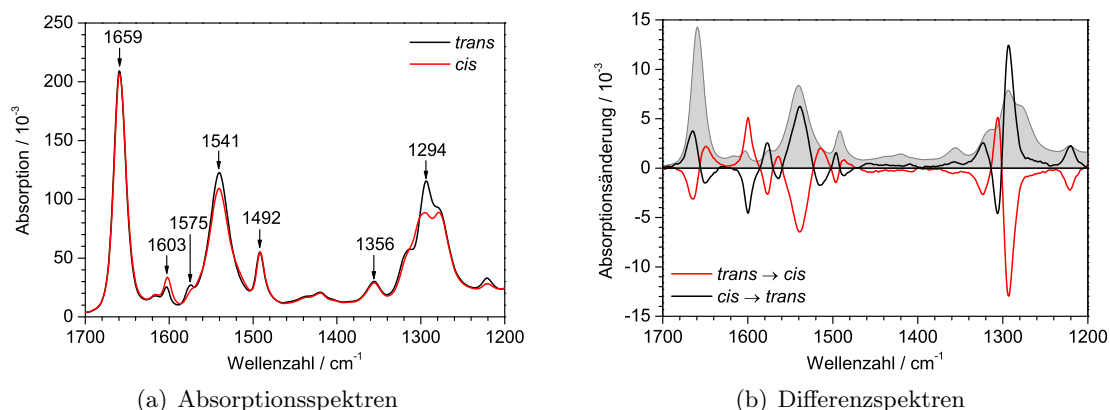


Abbildung 6.11: (a) zeigt die IR Absorptionsspektren von *trans*- bzw. *cis*-Isomer des Azoschalters im photostationären Gleichgewicht in DMSO- d_6 . Die Zuordnung der Banden erfolgt im Text (vgl. Tabelle 6.3). Die entsprechenden stationären Differenzspektren sind in (b) dargestellt, dabei ist zum Vergleich das willkürlich skalierte Absorptionsspektrum der *trans*-Form in grau hinterlegt.

Bei der Untersuchung der *trans* \rightarrow *cis*-Reaktion sind folglich 98 % bis 99 % der angeregten Moleküle tatsächlich in der *trans*-Konfiguration. Im Rahmen der Messgenauigkeit spielt der Beitrag der *cis*-Isomere zu den Absorptionsänderungen hier keine Rolle. Umgekehrt liegen bei der *cis* \rightarrow *trans*-Reaktion etwa 10 % bis 15 % der angeregten Moleküle in der *trans*-Konfiguration vor, es ist also ein messbarer Beitrag der *trans*-Form zu erwarten.

Absorptionsspektren im infraroten Spektralbereich

Die Interpretation der zeitaufgelösten Infrarotspektren des Azoschalters und insbesondere der spätere Vergleich mit dem Azocollagen erfordert eine möglichst umfassende Charakterisierung und Bandenzuordnung. Abbildung 6.11 zeigt die Absolut- und Differenzspektren der Isomere des Azoschalters in DMSO- d_6 im Spektralbereich von 1200 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} . Die Absorptionsbanden können den vorhandenen funktionellen Gruppen [48, 49, 376] sowie den Peptidmoden (vgl. Abschnitt 2.3.1) zugeordnet werden. Dafür wurde die harmonische Frequenzanalyse der durchgeführten quantenchemischen Rechnung ebenfalls herangezogen. Allerdings zeigen die berechneten Schwingungsmoden teilweise Verschiebungen von bis zu 100 cm^{-1} , da die Berechnung für das Vakuum erfolgte.

Wichtige Hinweise ergeben aus dem Vergleich mit dem Absorptionsspektrum des Azocollagens, wobei hier besonders der Einfluss des Lösungsmittels (H/D-Austausch) eine Rolle spielt. Da sich die Schaltersignatur in den transienten IR-Differenzspektren des Azocollagens eindeutig nachweisen lässt, erlaubt der Vergleich aller vorliegenden Spektren eine detaillierte und weitgehend eindeutige Interpretation. Insofern sei hier bereits auf das Absorptionsspektrum des Azocollagens im infraroten Spektralbereich (ab S. 207) bzw. dessen Feinstruktur (ab S. 213) verwiesen. Die Zuordnung der Absorptionsbanden ist in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

Position/cm ⁻¹	Charakter	Bezeichnung
1659	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amid I
1541	$\delta_s(\text{N}-\text{H})+\nu(\text{C}-\text{N})$	Amid II
1294	$(\delta_s(\text{N}-\text{H})+\nu(\text{C}-\text{N}))$	(Amid III)
1603	$\nu(\text{C}-\text{C})+\delta(\text{C}-\text{H})$ aromatisch	Schwingungsmoden der Phenylringe
1575		
1492		
1356	$\gamma_w(\text{C}-\text{H}_2)$	Kippschwingung der (C-H ₂)-Gruppe zwischen Amino- und Acetylen-Gruppe

Tabelle 6.3: Zuordnung der IR-Absorptionsbanden des Azoschalters in DMSO-*d*₆. Die angegebenen Bandenpositionen entsprechen den Maxima für das *trans*-Isomer. Bei 1300 cm⁻¹ sind zahlreiche Banden überlagert, die Zuordnung zur Amid III Mode ist daher mit größerer Unsicherheit behaftet.

Die größten Signale können den Amidmoden der Peptidgruppen des Azoschalters zugeordnet werden. Bei 1659 cm⁻¹ liegt die Absorptionsbande der Amid I-Mode und bei 1541 cm⁻¹ liegt die der Amid II-Mode. Die ausgeprägten Differenzsignale in diesen Bereichen weisen auf unterschiedliche Konformationen der Peptidbindungen in der *trans*- und *cis*-Konfiguration des Azoschalters hin. Im Spektralbereich von 1200 cm⁻¹ bis 1400 cm⁻¹ ist die Amid III-Mode zu erwarten, die ebenfalls sensitiv für die Konformation des Rückgrats ist. Diese ist im Bereich um 1300 cm⁻¹ durch eine Vielzahl weiterer Schwingungsbanden überlagert, so dass eine eindeutige Identifikation im Absorptionsspektrum schwierig ist. Allerdings sind in den Differenzspektren (Abb. 6.11(b)) zwei Bereiche mit großen Amplituden (1295 cm⁻¹ und 1220 cm⁻¹) zu erkennen. Der Vergleich mit dem Azocollagen zeigt, dass dieses in DMSO-*d*₆ ebenfalls große Differenzsignale bei 1295 cm⁻¹ aufweist [373], die in EG-*d*₆:D₂O nach Deuterierung der Aminogruppe verschwinden [375]. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die in diesem Bereich ebenfalls absorbierenden (C-H_{*x*})-Deformationsschwingungen eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Konformation aufweisen oder auf den H/D-Austausch reagieren. Folglich kann diese Bande der Amid III Schwingung zugeordnet werden, wenn auch mit einer gewissen Unsicherheit.

Bei 1603 cm⁻¹, 1574 cm⁻¹ und 1492 cm⁻¹ finden sich die aromatischen C-C-Streckschwingungen der Phenylringe. Für Aromaten werden drei mittelstarke Banden bei etwa 1600 cm⁻¹, 1580 cm⁻¹ und 1500 cm⁻¹ angegeben, wobei die letzte oft die stärkste der drei ist [376]. Phenylalanin besitzt ebenfalls eine Bande bei 1494 cm⁻¹, die der C-C-Streckschwingung des aromatischen Ringes zugeordnet wird [377]. Die durchgeführte Frequenzanalyse zeigt, dass die Ringmoden mit verschiedenen Deformationsschwingungen der Substituenten (N-H, C-H_{*x*}) koppeln, was auch die ungewöhnlich große Amplitude der Bande bei 1492 cm⁻¹ erklärt. Die gerechneten Frequenzen sind jedoch zu ungenau für eine explizite Zuordnung der drei Banden zu den Schwingungsmoden, daher wird auf genauere Angaben verzichtet. Abweichungen der mittels DFT berechneten Frequenzen zeigen sich übrigens auch in entsprechenden Veröffentlichungen für Azobenzol [301, 303].

Die Bande bei 1356 cm^{-1} kann der C–H₂-Kippschwingung der Methylengruppen zwischen den Amino- und Acetylengruppen zugeordnet werden. Es handelt sich um eine lokale Mode, Kopplungen mit benachbarten Gruppen spielen nahezu keine Rolle. Als möglicher Bereich für diese Schwingungen wird 1170 cm^{-1} bis 1282 cm^{-1} angegeben [49, 377], die Frequenzanalyse liefert $\approx 1345\text{ cm}^{-1}$ für diese Gruppe und $\approx 1256\text{ cm}^{-1}$ für die Kippschwingung der Methylengruppe zwischen Acetylengruppe und Chlor. Andere infrarotaktive Schwingungsmoden mit vergleichbarer Oszillatorstärke sind in diesem Bereich nicht zu erwarten und die Zuordnung wird durch die Bleichsignale in den transienten IR-Spektren (Abb. 6.12 auf S. 174) und die Untersuchung des Azocollagens weiter bestätigt (z. B. Tab. 6.7, S. 215). Da sich die Konjugation des chromophoren π -Systems noch über die Peptidbindung erstrecken kann, lässt sich ein direktes Ausbleichen der Bande der benachbarten C–H₂-Gruppe erwarten, für die weiter vom Chromophor entfernte Gruppe ist dies nicht der Fall. Da bei der Kopplung an die Collagenstränge das terminale Chloratom durch die Bindung zum Mercaptoprolin ersetzt wird, sollte außerdem eine deutliche Verschiebung der Bande auftreten, nachdem der Azoschalter an die Peptidsequenz angekoppelt wurde.

Im Dauerstrichdifferenzspektrum lassen sich noch einige kleinere Signale erkennen, deren Herkunft hier nicht geklärt werden kann: beispielsweise positive Beiträge bei 1564 cm^{-1} und 1515 cm^{-1} im *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektrum (Abb. 6.11(b), rote Kurve). Das Differenzsignal bei 1564 cm^{-1} könnte unter anderem mit der Rotverschiebung der Bande bei 1574 cm^{-1} oder dem Entstehen einer neuen Bande erklärt werden. Ebenso ließe sich die Differenzbande bei 1515 cm^{-1} auf die Änderung der Molekülsymmetrie bei der Isomerisierung zurückführen. Das wäre naheliegend, da bei Azobenzol die N=N-Streckschwingung für das *trans*-Isomer nicht IR-aktiv ist und beim *cis*-Isomer bei 1512 cm^{-1} liegt [62]. Eine andere schlüssige Erklärung wäre die Verbreiterung der Amid II-Bande (1541 cm^{-1}) beim *trans* \rightarrow *cis*-Übergang. Eine inhomogene Linienverbreiterung wäre im Einklang mit der Annahme der ungenau definierten *cis*-Struktur als Folge der sterischen Beanspruchung durch die Substituenten. Auf Basis der vorliegenden Daten lässt sich keine eindeutige Zuordnung ableiten und in Bezug auf die zeitaufgelösten Messungen ist diese auch nicht erforderlich.

Verfahren zur Identifikation der Substruktur wie das Bilden der 2. Ableitung der Spektren oder die für das Azocollagen erfolgreich eingesetzte Feinstrukturverstärkung (vgl. Abb. 6.29, S. 214) brachten keine Verbesserung. Auf die Darstellung wird daher verzichtet.

6.5.3 Transiente IR-Differenzspektren der *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung

Vorbemerkungen

Der Messbereich (1330 cm^{-1} – 1700 cm^{-1}) konnte nicht mit einer einzigen Messung abgedeckt werden, deshalb wurden drei Einzelmessungen durchgeführt und zu einem Datensatz zusammengefasst (Abb. 6.12). Alle Messungen erfolgten im Bereich vor 1 ps mit äqui-

distanten Schritten ($\Delta t = 0,1$ ps). Zwischen 1 ps und 1,8 ns wurde an 70 Positionen mit exponentiell wachsendem Abstand gemessen.

Für die Messungen im Spektralbereich von 1330 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1} wurde das Gitter 3 ($d = 75/\text{mm}$) eingesetzt. Angeregt wurde mit der SFG bei 350 nm mit 250 nJ Pulsenergie, die Datenerfassung erfolgte hier im referenzierten Modus. Nach dem Ausfall mehrerer Elemente der Referenz-Detektorzeile, konnte die Datenaufnahme zunächst nicht abgeschlossen werden. Die letzte Messung ($1600\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$) wurde zu einem späteren Zeitpunkt mit verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis nachgeholt. Dazu wurde mit der SFG bei 330 nm mit 300 nJ Pulsenergie angeregt, Gitter 2 ($d = 150/\text{mm}$) verwendet und der unreferenzierte Modus der Datenverarbeitung benutzt.

Die Signalamplituden wurden durch globale Skalierung der Datensätze angeglichen, wobei auf beste Übereinstimmung in den überlappenden Wellenlängenbereichen geachtet wurde. Damit ergeben sich stetige Übergänge im Bereich der reaktionsinduzierten Differenzsignale. Die Grenzen der einzelnen Messbereiche sind jedoch an den kohärenten Signalen um den Zeitnullpunkt noch deutlich zu erkennen.

Das nachträgliche Verschieben des Zeitnullpunktes führt zu Darstellungsproblemen: Die 2d-Grafiken der transienten Absorptionsänderung mit eingeschränktem Zeitbereich (Abb. 6.12(b) und 6.12(c)) zeigen scheinbar einen verzögerten Anstieg der Signale im Bereich von 1450 cm^{-1} bis 1330 cm^{-1} . Dieser Effekt ist ein reines Grafikproblem: Bei Darstellung des gesamten Zeitbereiches tritt er nicht auf und die Analyse der Daten bleibt davon ebenfalls unberührt (Abb. 6.12(a)).

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch störende, kohärente Signale zu vermeiden, wurde die globale Analyse für Verzögerungszeiten ab 0,5 ps durchgeführt. Aussagen über kurzlebige Prozesse könnten ohnehin nur sehr eingeschränkt gemacht werden und spielen für die Zielsetzung – die Untersuchung der lichtinduzierten Entfaltung des Azocollagens – keine Rolle.

Eine Dispersionskorrektur innerhalb der einzelnen Datensätze wurde nicht durchgeführt: Die kohärenten Effekte wie PFID und XPM lassen sich für das Lösungsmittel nicht unabhängig bestimmen und subtrahieren. Insbesondere das XPM-Signal mit seiner starken zeitlichen und spektralen Abhängigkeit verhindert die genaue Bestimmung des echten Zeitnullpunktes (vgl. Abb. 3.18, S. 67). Während der Fehler durch die Dispersion für Wellenzahlen $> 1470\text{ cm}^{-1}$ vernachlässigbar ist, kann man ihren Einfluss bei kleineren Wellenzahlen deutlich erkennen. Allerdings liegt selbst hier der Fehler unterhalb der Kreuzkorrelationsbreite und es werden keine kurzlebigeren Signale interpretiert. Damit ist die gewählte Auswerteprozedur insgesamt gerechtfertigt.

Alle Messungen erfolgten für folgende Winkel zwischen den Polarisierungsebenen des Anreg- und Abtastlichtes: parallel, senkrecht und magischer Winkel ($54,7^\circ$). Die Auswertung der kinetischen Parameter erfolgt für die im magischen Winkel erhaltenen Daten, so dass Einflüsse des Anisotropiezerfalls (z. B. Rotationsdepolarisation) ausgeschlossen sind und man die gewünschte Populationskinetik erhält. Die Auswertung der Anisotropieinformationen erfolgt dann gesondert.

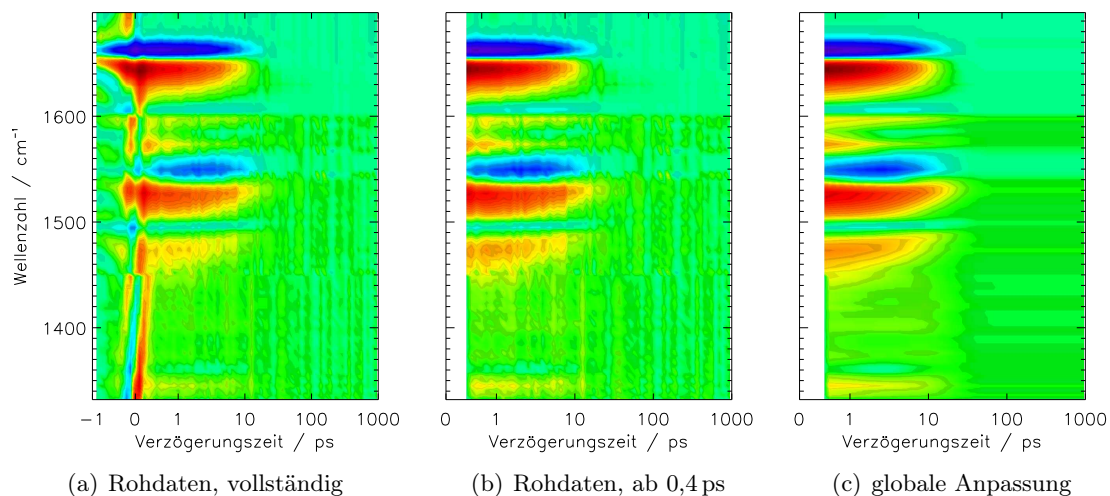


Abbildung 6.12: Transiente Absorptionsänderung des Azoschalters (*trans* → *cis*) mit Abtastung im magischen Winkel, bestehend aus drei Einzelmessungen. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. In (a) ist die PFID-Signatur vor dem Zeitnullpunkt sowie die um den Zeitnullpunkt dominierende Kreuzphasenmodulation deutlich zu erkennen. In Abb. (b) wird nur der Zeitbereich ab 0,4 ps dargestellt, was zu einer etwas besseren Farbskala führt. Im Zeitbereich von 0,5 ps bis 1,8 ns wurde eine globale Fitanalyse durchgeführt. (c) zeigt das Ergebnis für die Anpassung mit 4 exponentiellen Zerfallsfunktionen.

Ergebnisse der fs-IR-Messungen

Abbildung 6.12 zeigt eine Übersicht der transienten Absorptionsänderungen nach Anregung in der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande des *trans*-Azoschalters. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für größere Verzögerungszeiten. Positive Signale werden in rot und negative in blau dargestellt. Die Messung im Bereich von 1600 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} wurde mit verbesserter Auflösung zu einem späteren Zeitpunkt gemessen und fällt daher optisch heraus.

Auftretende Effekte Die transienten Differenzspektren zeigen bei negativen Zeiten die charakteristische PFID-Signatur (vgl. Abb. 3.16, S. 63). Diese ist besonders ausgeprägt bei 1660 cm^{-1} , sie lässt sich jedoch für alle instantanen Signale außer der Bande bei 1350 cm^{-1} eindeutig nachweisen.

In der Nähe des Zeitnullpunktes ($-0,5\text{ ps} - 0,5\text{ ps}$) überlagert die Kreuzphasenmodulation die spektralen Änderungen der Probe. Diese lässt sich zwischen 1330 cm^{-1} und 1450 cm^{-1} eindeutig erkennen, da hier nur schwache Signale des Azoschalters vorliegen und deshalb die XPM dominiert. Bei 1450 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} erkennt man die Grenzen der einzelnen Messbereiche, die Signale überlappender Kanäle wurden zuvor entfernt.

Probendynamik Ab etwa 0,4 ps treten nur noch die lichtinduzierten spektralen Änderungen des Azoschalters auf, ohne Überlagerung durch störende kohärente Effekte.

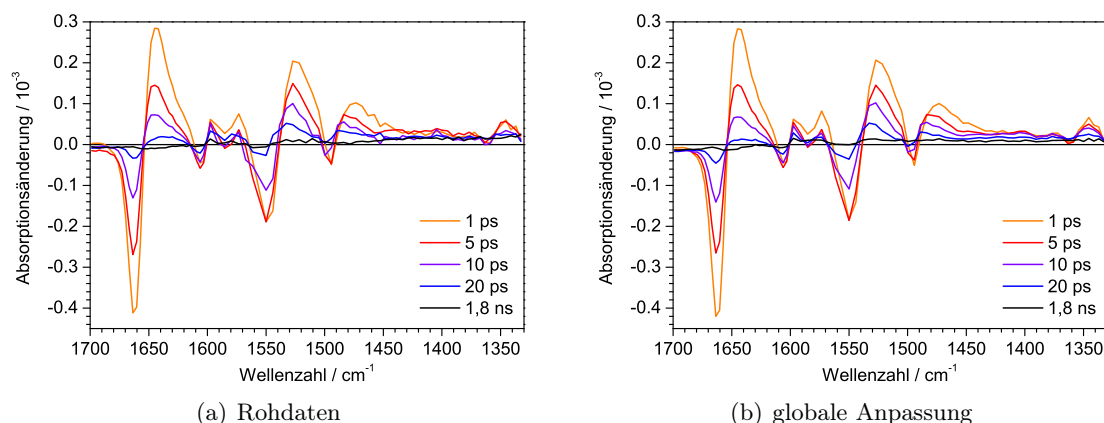


Abbildung 6.13: Transiente Differenzspektren des Azoschalters ($trans \rightarrow cis$) zu ausgewählten Verzögerungszeiten. In (a) sind die unverarbeiteten Daten dargestellt. Zum Vergleich sind in (b) dieselben Spektren nach der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten gegeben.

Man erkennt instantan auftretende Differenzbanden, die auf der Zeitskala von 10 ps größtenteils wieder zerfallen. Diese bestehen aus einem (negativen) Bleichsignal mit einem korrespondierenden (positiven) Absorptionssignal auf der niederenergetischen Seite, die typische Signatur einer Rotverschiebung. Der bei fast allen Signalen erkennbare PFID-Effekt zeigt, dass es sich bei den negativen Signalen um Schwingungen des elektronischen Grundzustands handelt, die infolge der elektronischen Anregung ausbleichen.

Das Absorptionsspektrum der transienten Spezies (*Produkt*) zum Zeitpunkt t kann theoretisch aus dem Absorptionsspektrum des ausgebleichten Grundzustands (*Edukt*) und dem Differenzspektrum zum Zeitpunkt t berechnet werden [192]. Dazu wird zu dem Differenzspektrum ein entsprechend der Konzentration der angeregten Moleküle skaliertes Eduktspektrum addiert. Die Bestimmung des richtigen Skalierungsfaktors ist dabei der entscheidende Schritt, da der Anteil angeregter Moleküle allgemein nicht bekannt ist. Zu einer unteren Abschätzung der richtigen Skalierung gelangt man, wenn das resultierende Produktspektrum keine negativen Beiträge mehr aufweist. Das so errechnete Produktspektrum der transienten Spezies bei 1 ps und der auf langen Verzögerungszeiten auftretenden Spezies (zerfallassoziertes Spektrum zur Zeitkonstanten $\tau_4 = \infty$) wird in Abb. 6.14 gezeigt. Die auf kurzen Zeiten auftretende Verbreiterung und Rotverschiebung der transienten Banden im Vergleich zum Absorptionsspektrum ist deutlich zu erkennen. Die Interpretation der langlebigen Spezies erfolgt ab Seite 181.

Zuordnung der transienten Differenzbanden Das IR-Absorptionsspektrum des Azoschalters wurde bereits in Abschnitt 6.5.2 beschrieben (vgl. Tab. 6.3, S. 171). Auf dieser Basis können die Banden in den transienten IR-Differenzspektren direkt zugeordnet werden: Die größten Signale stammen von der Amid I- (1659 cm^{-1}) und der Amid II-Mode (1541 cm^{-1}) der Peptidgruppen. Kleinere Beiträge lassen sich den Schwingungsmoden der Phenylringe (1603 cm^{-1} , 1575 cm^{-1} , 1492 cm^{-1}) zuordnen. Das Bleichsignal bei

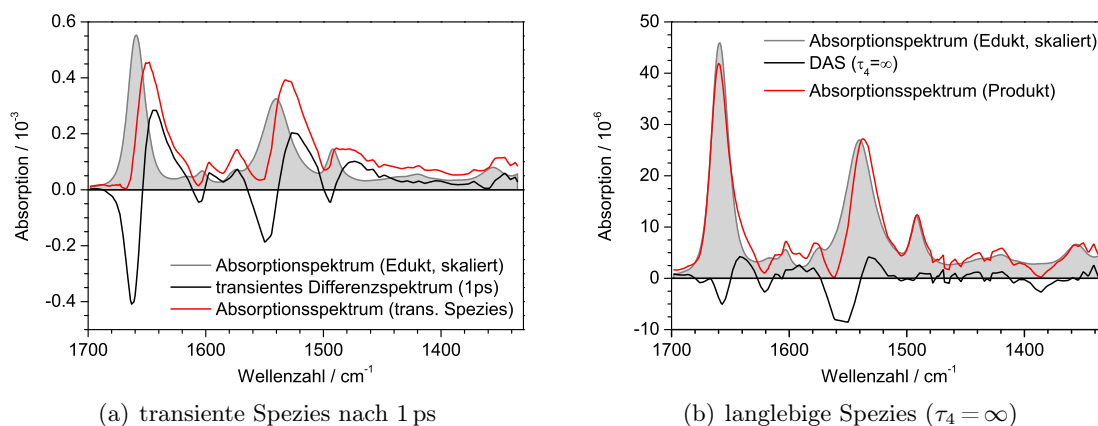


Abbildung 6.14: Ausbleichkorrigierte Absorptionsspektren transienter Spezies des Azoschalters (*trans* \rightarrow *cis*): Zu den Differenzspektren wird ein skaliertes Absorptionsspektrum des *trans*-Isomers (*Edukt*, grau hinterlegt) addiert. Dies wurde für das transiente Differenzspektrum nach 1 ps (a) und das basislinienbereinigte, zerfallassozierte Spektrum der langlebigen Komponente (b) durchgeführt.

1575 cm^{-1} ist durch eine positive Absorptionsänderung überlagert und daher in der 2d-Grafik erst ab ca. 1 ps deutlich sichtbar.

Ein kleines Differenzsignal bei 1350 cm^{-1} ist nach dem Abklingen der Kreuzphasenmodulation erkennbar, ein zugehöriger PFID kann jedoch nicht nachgewiesen werden. Die spektrale Lage entspricht der einer $\gamma_w(\text{C-H}_2)$ -Mode, wobei sich die Frage nach der zugehörigen Methylgruppe stellt. Da es instantan auftritt und auf derselben Zeitskala zerfällt wie die Signale der Azobenzol- und Peptidmoden, erscheint die Beteiligung der Methylgruppe zwischen Acetylen und Chlor unwahrscheinlich. Außerdem erscheint dasselbe Signal nahezu unverschoben bei den Messungen am Azocollagen (Abb. 6.42, S. 235). Dort ist das Chlor durch das Schwefelatom des Mercaptoprolins ersetzt, die Frequenzverschiebung aufgrund der geänderten Masse der benachbarten Gruppe tritt jedoch nicht auf. Damit kann diese Bande tendenziell der Methylgruppe zwischen der Amino- und der Acetylenfunktion des Azoschalters zugeschrieben werden.

Die Amplituden der beobachteten Signale sind in den transienten Spektren besser zu erkennen (Abb. 6.13) als in den 2d-Grafiken. Augenscheinlich korrelieren die Bleichsignale direkt mit den Absorptionen im IR-Absorptionsspektrum (Abb. 6.11(a), S. 170), wobei die Überlagerung mit positiven Signalen eine quantitative Auswertung verhindert. Die Zeitabhängigkeit ist nicht monoexponentiell, neben unterschiedlichen Abklingdauern der einzelnen Differenzsignale sind auch spektrale Verschiebungen zu beobachten. Für die Amid II-Bande (1541 cm^{-1}) ist das besonders ausgeprägt, während die Amid I-Bande (1659 cm^{-1}) keine offensichtliche Zeitabhängigkeit von Position oder Bandbreite aufweist.

Bei langen Verzögerungszeiten sind noch kleine Differenzsignale zu erkennen. Diese bleiben ab ca. 50 ps bis zur maximalen Verzögerungszeit von 1,8 ns praktisch konstant. Die Amplituden dieser residualen Absorptionsänderung sind sehr klein und sie werden erst im Rahmen der globalen Analyse ausgewertet und interpretiert.

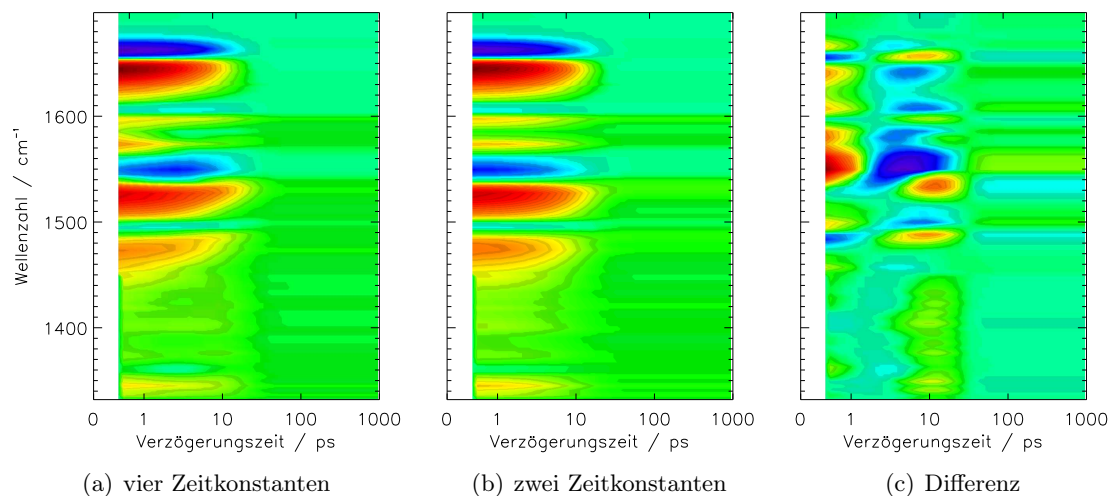


Abbildung 6.15: 2d-Grafiken der globalen Anpassung mit vier (a) und zwei (b) Zeitkonstanten und deren Differenz (c). Die globale Abnahme der Signalintensität wird monoexponentiell bereits gut beschrieben. Markante Unterschiede ergeben sich in der Amid II-Bande sowie an den Flanken der übrigen Differenzbanden. Die Farbskalen der drei Grafiken sind nicht miteinander vergleichbar, die Differenz der Anpassungsfunktionen in (c) ist geringer als die Signale in (a) oder (b).

Globale Analyse

Die quantitative Auswertung der Ultrakurzzeitmessungen erfolgte durch die Anpassung einer Summe aus exponentiellen Zerfallsfunktionen (Gleichung 3.14, S. 60).

Bestimmung der optimalen Anzahl von Zeitkonstanten In erster Näherung lassen sich die Daten bereits mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen beschreiben. Dabei wird eine Zeitkonstante auf den Wert unendlich ($\tau_2 := \infty$) festgesetzt um die residualen Absorptionsänderungen bei langen Verzögerungszeiten zu modellieren. Für die frei angepasste Komponente ergibt sich eine Zeitkonstante von $\tau_1 = 7,9$ ps, das Ergebnis ist in Abb. 6.15(b) als 2d-Grafik dargestellt.

Der Vergleich mit den Rohdaten aus Abb. 6.12(b) zeigt, dass der Zerfall der Maxima und Minima zwar grob wiedergegeben wird, aber noch signifikante Abweichungen der angepassten Kurve von den Daten auftreten. Folglich stellt die Zeitkonstante von 8 ps eine zu grobe Näherung dar, die nur die Tendenz der größten Signale widerspiegelt. Bei genauer Betrachtung zeigt sich, dass die Daten komplexe Zeitabhängigkeiten aufweisen, die eine multiexponentielle Anpassung erfordern:

- Spektrale Verschiebungen und Änderungen der Bandbreite können mit nur zwei Zeitkonstanten nicht angepasst werden, was an den Schultern der Banden und in der Nähe der Nullstellen des Differenzspektrums deutlich wird (Abb. 6.16(b)).
- Die Transienten im Bereich der Amid I- und Amid II-Banden können weder für negative noch für positive Differenzsignale durch Skalierung ineinander überführt

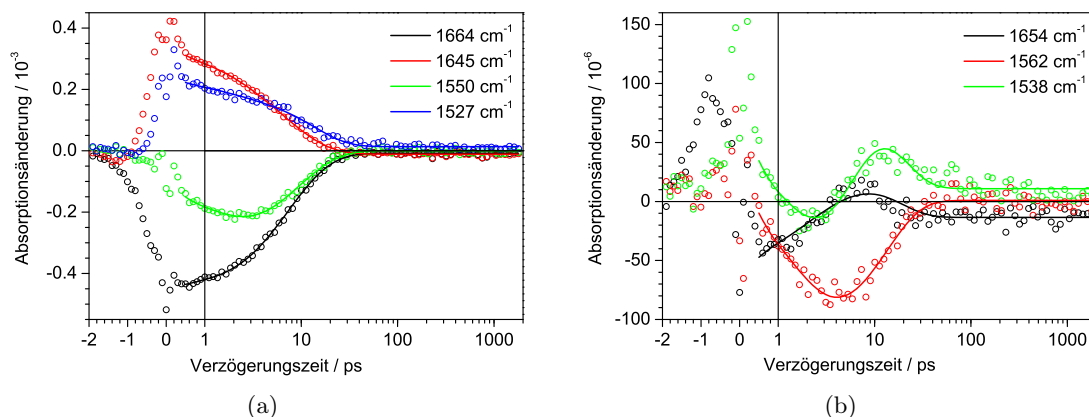


Abbildung 6.16: Transienten des Azoschalters (*trans* \rightarrow *cis*) bei ausgewählten Wellenzahlen. Die einzelnen Signale wurden entsprechend ihrer Amplitude in zwei getrennten Diagrammen dargestellt. Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten als Linie dargestellt. Bei den kleinen Signalen an den Schultern der Differenzbanden ist das nicht monoexponentielle Verhalten deutlich erkennbar.

werden. Dieser Unterschied in der Kinetik beider Spektralbereiche erfordert eine Anpassung mit mindestens zwei Exponentialfunktionen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten.

- Einige Signale erreichen ihre Maximal- bzw. Minimalamplituden nicht am Zeitnullpunkt sondern einige Pikosekunden verzögert. Als Beispiel ist in Abbildung 6.16(a) das Bleichsignal der Amid II-Mode bei 1550 cm^{-1} gezeigt, in der 2d-Grafik ist dieser Effekt auch bei den Bleichsignalen 1604 cm^{-1} , 1492 cm^{-1} und 1356 cm^{-1} nachvollziehbar.

Mit einer weiteren Komponente ergibt sich zwar eine bessere Anpassung der Kurven, es treten jedoch insbesondere in den Flanken der Differenzsignale noch systematische Abweichungen von den Messdaten auf. Erst die Anpassung der Daten durch eine Summe aus vier Zerfallsfunktionen, von denen eine festgesetzt wurde ($\tau_4 := \infty$), zeigt im Rahmen der Messgenauigkeit keine signifikanten Abweichungen von Datenpunkten und angepasster Kurve (Abb. 6.12(c)). Dies wurde sowohl durch Kontrolle der Transienten aller Kanäle als auch anhand der Differenz von angepassten Kurven und Rohdaten verifiziert.

Die erhaltenen frei angepassten Zeitkonstanten sind: $\tau_1 = 1,4\text{ ps}$, $\tau_2 = 5,6\text{ ps}$ und $\tau_3 = 9,3\text{ ps}$, wobei alle Werte mit höherer Unsicherheit behaftet sind als es die Dezimalstelle andeutet. Da sich die einzelnen Komponenten bei der globalen Anpassung gegenseitig beeinflussen ist eine Fehlerrechnung nicht ohne weiteres möglich und eine Angabe von unabhängigen Fehlern schwierig. Aus dem Vergleich verschiedener Anpassungsszenarien mit den Rohdaten kann eine Fehlerobergrenze abgeschätzt werden. Änderungen der Zeitkonstanten von mehr als ca. 10% können nicht mehr durch die Variation der übrigen

Parameter kompensiert werden und führen so zu systematischen Abweichungen der Kurven von den Daten.

Eine globale Anpassung mit fünf Zeitkonstanten liefert Werte von $\tau_1 = 0,9$ ps, $\tau_2 = 4,2$ ps, $\tau_3 = 6,9$ ps, $\tau_4 = 100$ ps und $\tau_5 := \infty$. Das zerfallassozierte Spektrum der zusätzlichen Zeitkonstante von 100 ps weist im Vergleich mit den drei übrigen sehr kleine Amplituden auf. Es ergibt sich keine signifikante Verbesserung der Anpassung und die DAS der kürzeren Zeitkonstanten ändern sich nur minimal. Insgesamt ergeben sich keine Hinweise darauf, dass bei Verwendung einer Summe aus vier Exponentialfunktionen eine unzureichende Beschreibung des Datensatzes resultiert. Also ist davon auszugehen, dass eine globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten die optimale Parametrisierung der Messergebnisse darstellt.

In Abbildung 6.15 sind die Unterschiede zwischen optimaler Anpassung und nicht ausreichender Parameteranzahl als 2d-Grafik dargestellt. Die größten Differenzen ergeben sich an den Schultern der Differenzbanden sowie beim Anstieg der Signale. Dies ist zum einen die Folge der Zeitabhängigkeit von Bandenposition und Bandbreite und zum anderen durch die verzögert erreichten Signalmaxima bzw. -minima bedingt. In dieser Darstellung werden auch die Unterschiede zwischen den Zeitabhängigkeiten im Amid I- und im Amid II-Bereich deutlich. Die Abweichungen zwischen den angepassten Datensätzen sind zwischen 1530 cm^{-1} und 1570 cm^{-1} besonders ausgeprägt, aber zwischen 1650 cm^{-1} und 1670 cm^{-1} verhältnismäßig gering.

Abbildung 6.16 enthält die transienten Absorptionsänderungen ausgewählter Wellenzahlen im Bereich der Amid-Banden zusammen mit den Kurven aus der optimierten globalen Anpassung. Diese Transienten zeigen, dass die komplexe wellenzahlabhängige Kinetik durch eine Summe aus vier Exponentialfunktionen gut wiedergegeben wird. Der Unterschied zwischen den Signalen der beiden Amid-Moden findet sich auch in den gezeigten Transienten wieder: bei 1550 cm^{-1} tritt das Minimum des Bleichsignal erst deutlich verzögert auf. Die Anzahl der enthaltenen Zeitkonstanten lässt sich aber vor allem an die Schultern der Differenzbanden und den Nulldurchgängen der transienten Differenzspektren verifizieren. Allein für die Anpassung der Transiente bei 1538 cm^{-1} werden mindestens drei Exponentialfunktion benötigt, da diese zwei Wendepunkte aufweist.

Zerfallassozierte Spektren Die zerfallassozierten Spektren für die globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten finden sich in Abb. 6.17(a). Sie werden hier zunächst beschrieben und die Beobachtungen werden dann im nächsten Abschnitt interpretiert.

Das Spektrum zu τ_1 besitzt nahezu im gesamten Spektralbereich eine positive Amplitude und beschreibt folglich die Abnahme von positiven oder die Zunahme von negativen Differenzbanden. Die Maxima dieses Spektrums bei 1664 cm^{-1} , 1603 cm^{-1} , 1579 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} und 1494 cm^{-1} befinden sich auf den Wellenzahlen der instantan ausgebleichten Banden. Dieses Spektrum ist daher mit dem Ausbleichen des Grundzustandsspektrums assoziiert, es finden sich keine Übereinstimmungen mit den positiven Differenzbanden

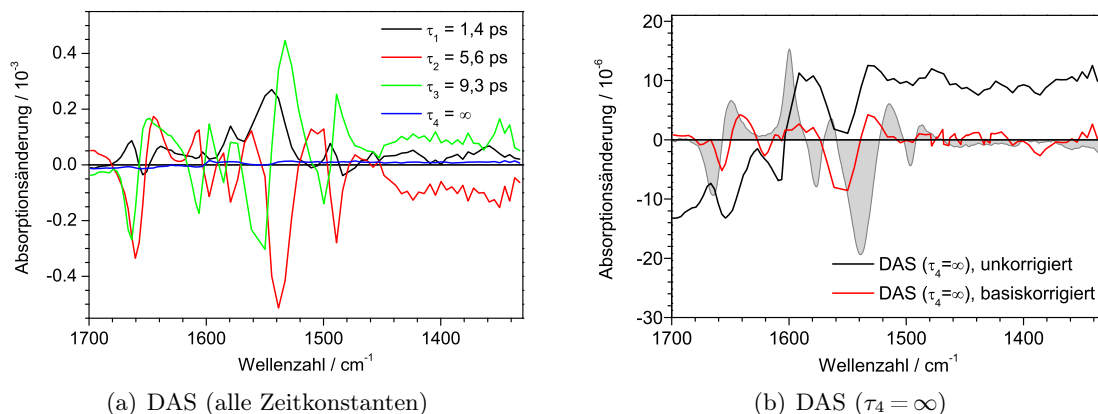


Abbildung 6.17: Zerfallasoziierte Spektren des Azoschalters (*trans* → *cis*) für die globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten (a). Die konstante Komponente ($\tau_4 = \infty$) wird in (b) zusammen mit einem basislinienbereinigten Spektrum dargestellt (siehe Abschnitt 3.2.2). Zum Vergleich ist das willkürlich skalierte *trans* → *cis*-Differenzspektrum (Abb. 6.11(b), S. 170) in grau hinterlegt.

auf kurzen Zeitskalen. Demzufolge modelliert diese Komponente im Wesentlichen das verzögerte Ausbleichen von Grundzustandsschwingungen.

Die Spektren der Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 besitzen die größten Amplituden – allerdings überwiegend mit entgegengesetzten Vorzeichen. Das bedeutet, dass sich beide Komponenten teilweise kompensieren. Die Ursache für diese komplizierte Struktur sind die Änderung von Position und Breite der Absorptionsbanden der transienten Spezies. Dies wird durch Exponentialfunktionen mit leicht unterschiedlichen Zeitkonstanten modelliert, diese lassen sich allerdings nicht direkt auf diskrete Übergänge zwischen molekularen Zuständen oder Energieniveaus zurückführen. Auch der Zerfall des gesamten Differenzsignals ist in den Amplituden nicht mehr sichtbar, diese Information ist in der Summe beider Komponenten kodiert.

Die langlebige Komponente τ_4 stellt das lichtinduzierte Differenzspektrum nach dem Abklingen der kurzlebigen Prozesse dar. Die Amplitude von ca. 10×10^{-6} macht nur noch etwa 2% des Differenzsignals am Zeitnullpunkt aus. Das Spektrum liegt an der Auflösungsgrenze des Experiments und weist im Bereich der Amid I-Bande eine gestörte Basislinie auf, da eine Referenzierung zum Zeitpunkt dieser Messung aufgrund defekter MCT-Elemente in der Referenzzeile nicht möglich war. Einzelheiten zu diesem Störsignal und dessen Korrektur wurden bereits in Abschnitt 3.2.2 ab Seite 57 beschrieben. Hier sei nochmal darauf hingewiesen, dass es bei der durchgeführten Basislinienkorrektur zu Artefakten kommt, insbesondere wird der Schwerpunkt der korrigierten Messwerte in jedem Fall auf den Wert Null gesetzt.

Im Bereich unter 1600 cm^{-1} wurde referenziert gemessen, so dass solche Artefakte auszuschließen sind. Die hier auftretende Verschiebung der Basislinie bei $\Delta A = 10 \times 10^{-6}$ ist in allen Einzelmessungen und ebenso bei der Untersuchung der *cis* → *trans*-Isomerisierung zu finden (vgl. Abb. 6.22(b), S. 195).

Das Spektrum von τ_4 mit und ohne Verwendung der Basislinienkorrektur ist in Abbildung 6.17(b) gezeigt. Beide Datensätze wurden zusätzlich durch gleitende Mittelung über drei Kanäle geglättet. Zum direkten Vergleich ist ein entsprechend skaliertes *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektrum in die Grafik eingefügt (vgl. Abb. 6.11(b), S. 170). Es ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen dem residualen Differenzspektrum der zeitaufgelösten Messung und dem Differenzspektrum der photostationären Zustände. Offensichtlich wurden innerhalb der maximalen Zeitverzögerung die Gleichgewichtsgeometrien noch nicht erreicht, somit stellt sich die Frage welcher Zustand das Differenzspektrum auf langen Zeiten verursacht. Insbesondere bleibt zu klären, ob dieses Differenzsignal – zumindest anteilig – auf die *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung zurückzuführen ist.

Interpretation

Die Interpretation basiert auf Reaktionsmodellen, die für die *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung von Azobenzol entwickelt wurden und die auch für die Untersuchung von Azobenzolderivaten verwendet werden. Der untersuchte Azoschalter gehört zur Klasse der Azobenzoltypen, besitzt also ähnliche photochemische Eigenschaften wie reines Azobenzol. Damit ist die Interpretation der transienten Spektren analog zur bekannten Dynamik des Azobenzols gerechtfertigt. Diese wurde bereits in Abschnitt 6.2.3 ab Seite 145 ausführlich dargelegt.

Die Anregung mit einer Wellenlänge von 350 nm führt zur Besetzung des $S_2(\pi\pi^*)$ -Niveaus. Dieses wird über interne Konversion sehr schnell in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand entvölkert. Ob die Relaxation direkt oder über kreuzende Zustände, wie den postulierten $S(n^2\pi^{*2})$ erfolgt, ist für die Interpretation der Daten nicht wichtig und kann aufgrund der nicht ausreichenden Zeitauflösung auch nicht aus ihnen geschlossen werden. Beim Übergang in den Grundzustand wird mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die *cis*-Konfiguration angenommen. Auch der genaue Reaktionspfad – beispielsweise Rotation oder Inversion – spielt zunächst keine Rolle. Die Lebensdauer des elektronisch angeregten $S_1(n\pi^*)$ -Zustands liegt im Bereich einiger Pikosekunden, die Isomerisierungsquantenausbeute bei etwa 15 %. Lebensdauer und Quantenausbeute werden von den Substituenten beeinflusst und können vom reinen Azobenzol deutlich abweichen.

In den transienten IR-Differenzspektren tritt eine instantane Rotverschiebung zusammen mit der Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls bei nahezu allen ausgebleichten Schwingungsbanden auf. Beides ist die direkte Folge der Besetzung eines elektronisch angeregten Zustands und es ist naheliegend den Zerfall dieser Signale mit der Entvölkerung eines elektronisch angeregten Zustands zu identifizieren. Diese These wird durch die Ultrakurzzeitcharakterisierung im sichtbaren Spektralbereich bestätigt [375]: Diese Experimente zeigen, dass das Grundzustandsbleichen und die rotverschobenen Absorption elektronisch angeregter Zustände auf einer Zeitskala von etwa 10 ps nahezu vollständig zerfallen. Die globale Analyse ergibt drei Zeitkonstanten: $\tau_1 < 150$ fs, $\tau_2 = 0,4$ ps und $\tau_3 = 4,7$ ps.

Eine langlebige Komponente analog zu $\tau_4 = \infty$ wurde im den zeitaufgelösten Messungen im UV/vis-Bereich nicht gefunden [375]. Das bedeutet, dass die Isomerisierungsquantenausbeute unterhalb der Nachweisgrenze der Experimente im sichtbaren Spektralbereich

liegt. Daraus kann eine Obergrenze für die Quantenausbeute bestimmt werden, wobei das Vorgehen weitgehend analog zur Berechnung der ausbleichkorrigierten Spektren in Abbildung 6.14 ist: Aus dem Differenzspektrum am Zeitnullpunkt wird die Anzahl angeregter Moleküle abgeschätzt. Bei dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der dort präsentierten Messung wird angenommen, dass eine Absorptionsänderung von 5×10^{-4} noch sicher aufgelöst wird. Das fehlende Differenzsignal bei langen Verzögerungszeiten bedeutet, dass die Amplitude des induzierten *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektrums unterhalb dieser Nachweisgrenze liegt. Danach müssen etwa 10 % als Höchstgrenze der Isomerisierungsquantenausbeute angesehen werden.

Die instantan auftretende, dominante Rotverschiebung ist Folge der Besetzung des elektronisch angeregten Zustands. Allerdings stimmen die aus der globalen Analyse erhaltenen Zeitkonstanten nicht mit denen überein, die im infraroten Spektralbereich bestimmt wurden: Der $S_1 \rightarrow S_0$ Übergang wurde bei Lorenz mit zwei Zeitkonstanten ($\tau_2 = 0,4$ ps und $\tau_3 = 4,7$ ps) modelliert [375], während hier drei längere Zeitkonstanten gefunden wurden ($\tau_1 = 1,4$ ps, $\tau_2 = 5,6$ ps und $\tau_3 = 9,3$ ps).

Die Erklärung für die Abweichungen zwischen den beiden Experimenten liegt in der Schwingungsenergieumverteilung: Untersuchungen von Azobenzol und Azobenzolderivaten mittels transientser Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich ergaben bereits Hinweise auf Kühlprozesse im Pikosekundenbereich [131, 277, 323, 327, 359, 378]. Diese Prozesse machen sich im sichtbaren Spektralbereich nur geringfügig an den niederenergetischen Flanken bemerkbar [379] und werden daher in einer globalen Analyse unter Umständen nicht gefunden. Dagegen ist ihr Einfluss auf transiente IR-Differenzspektren groß: Die ultraschnelle Schwingungsrelaxation und der Übergang in den S_1 -Zustand wird mit der gegebenen Zeitauflösung zwar nicht aufgelöst, allerdings führen bereits diese Prozesse zu einer starken Temperaturerhöhung des Moleküls. Dieser Effekt ist noch größer nach der Rückkehr in den elektronischen Grundzustand und der vollständigen Umverteilung der Überschussenergie.

Mit dieser Erhöhung der molekularen Temperatur steigt die Besetzungswahrscheinlichkeit hochangeregter niederfrequenter Schwingungsmoden, deren anharmonische Kopplung an die hochfrequenten Moden eine weitere Rotverschiebung im transienten IR-Differenzspektrum erzeugt. Dieses verzögerte Ausbleichen findet sich auch in den vorliegenden Spektren, insbesondere im Amid II-Bereich wieder. Das Spektrum der Komponente τ_1 der globalen Analyse ist mit dieser Zunahme an Bleichsignalen verknüpft. Da die extrem schnelle $S_2 \rightarrow S_1$ -Relaxation hier zeitlich nicht aufgelöst wird, ergibt sich die Zuordnung von τ_1 zur Aufheizung des Moleküls nach der internen Konversion in den S_1 sowie den elektronischen Grundzustand. Die bei der Aufheizung entstehenden positiven Absorptionsdifferenzen sind im Vergleich zu den ausgebleichten Grundzustandsbanden stark verbreitert und werden daher vermutlich nicht aufgelöst, was das Fehlen negativer Amplituden im zerfallassozierten Spektrum erklärt.

Anschließende Kühlprozesse korrelieren mit einer Verringerung der Linienbreite und weniger rotverschoben Absorptionsmaxima der transienten Spezies. Der Rückgang der Rotverschiebung lässt sich in den positiven transienten Differenzbanden der gut erkennen, vor allem in den Bereichen von 1540 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1} und von 1490 cm^{-1} bis

1450 cm⁻¹. Die beobachtete transiente Verschiebung der Differenzbanden ist eine Folge dieser Kühlprozesse und begründet so die Komponenten τ_2 und τ_3 der globalen Analyse. Das Auftreten und die spektrale Charakteristik von Kühlprozessen in transienten IR-Spektren sind auch für vergleichbare Systeme beschrieben worden [62, 63, 192, 282, 283].

Die Zeitkonstanten für die elektronische Relaxation und das Kühlen sind jeweils im Bereich einiger Pikosekunden und beide Prozesse führen zu einer Rotverschiebung der betrachteten hochfrequenten Schwingungsmoden. Ihre Überlagerung lässt sich daher spektral und zeitlich nicht eindeutig trennen. Das mit der elektronischen Anregung korrelierte Signal sollte allerdings mit steigender Verzögerungszeit monoton abfallen, da die Population des angeregten Zustands abnimmt. Außerdem wird die Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls allein durch die elektronische Anregung bestimmt, während die Erhöhung der Molekültemperatur vor dem Zeitnullpunkt keine Rolle spielt. Mit der korrekten Modellierung des PFID-Signals wäre es theoretisch möglich, das Spektrum zum Zeitnullpunkt, also vor der Schwingungsenergieumverteilung, zu erhalten.

Auch die unterschiedliche Dynamik der Amid I- und Amid II-Mode erscheint jetzt plausibel: Die Amid I-Bande zeigt ein ausgeprägtes PFID-Signal aber eine geringe spektrale Verschiebung infolge der Temperaturerhöhung. Das ist eine Folge der Delokalisierung des π -Elektronensystems des Azobenzols, die sich auch über die Peptidbindung der Substituenten [24] und damit über die C=O-Gruppe erstreckt. Die Anregung des π -Systems beeinflusst daher direkt die Kraftkonstante bzw. Bindungslänge der C=O-Gruppe und dementsprechend die Amid I-Schwingungsfrequenz. Die Amid II-Mode zeigt im Vergleich ein gering ausgeprägtes PFID-Signal. Die elektronische Anregung selbst hat also einen geringeren Effekt auf ihre Absorptionsbande. Die deutliche Zunahme des Bleichsignals und auch die ausgeprägte spektrale Verschiebung in den ersten Pikosekunden lassen sich mit der Kopplung der Amid II-Mode an die niederfrequenten Schwingungen erklären. Insbesondere sollte eine Temperaturerhöhung die Wasserstoffbrückenbindungen der N-H-Gruppe beeinflussen – und so auch die Frequenz der Amid II-Mode.

Nun ist noch die Frage nach der Natur der langlebigen Komponente ($\tau_4 = \infty$) zu klären, insbesondere ob es sich um das *cis*-Isomer handelt. Der Vergleich ihres zerfallassozierten Spektrums mit dem *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektrum in Abbildung 6.17(b) offenbart deutliche Abweichungen, die es zu klären gilt.

Im Spektralbereich von 1330 cm⁻¹ bis 1600 cm⁻¹ zeigt sich eine signifikante positive Verschiebung der Basislinie, hier wurden die Daten im referenzierten Modus aufgenommen. Das ist die Folge der temperaturinduzierten Verbreiterung starker Lösungsmittelbanden bei 1050 cm⁻¹ und 2100 cm⁻¹. Diese spektrale Verbreiterung zeigt sich in temperaturabhängigen Spektren von reinem DMSO-*d*₆ und eine positive Basislinienverschiebung wird ebenfalls in transienten Differenzspektren von *cis*-Azobenzol in DMSO-*d*₆ bei langen Verzögerungszeiten beobachtet [62]. Im Bereich von 1600 cm⁻¹ bis 1700 cm⁻¹ ist die Basislinie wegen des Offset-Problems der unreferenzierten Messung gestört und kann daher nicht als verlässlich angesehen werden (vgl. Abschnitt 3.2.2, S. 57).

Analog zum NPA in Abschnitt 4.3.2 auf S. 84 kann auch hier die Temperaturerhöhung abgeschätzt werden: Mit dem Radius des Anregungsfokus von 150 μm und 50 μm Schichtdicke beträgt das angeregte Volumen $3,5 \times 10^{-12} \text{ m}^3$. Geht man von der vollständigen

Absorption des Anregungspulses aus, dann werden 300 nJ an Energie in diesem Volumen deponiert. Mit der Dichte von $1,1 \text{ g/cm}^3$, einem Molekulargewicht von 78 g/mol und der Wärmekapazität von 150 J/(K mol) von DMSO errechnet sich eine Temperaturerhöhung von etwa $0,04 \text{ K}$. Für diese Abschätzung wurden die Werte des nicht-deuterierten Lösungsmittels eingesetzt, was aber innerhalb des Fehlers vernachlässigt werden kann. Bei Beachtung der inhomogenen Intensitätsverteilung im Fokus und der exponentiellen Intensitätsabnahme beim Durchdringen der Probe ergeben sich große Temperaturgradienten. Der Temperatursprung ist also innerhalb des abgetasteten Probenvolumens nicht konstant, es treten deutliche Abweichungen nach oben und unten vom Durchschnittswert auf, die nicht innerhalb von 2 ns equilibrieren können. Entsprechend wird bei langen Verzögerungszeiten ein über das räumliche Temperaturprofil gemittelt Differenzspektrum gemessen. Eine Korrektur erfordert die genaue Kenntnis der räumlichen Temperaturverteilung innerhalb des Abtastfokus und war hier nicht möglich. Da die Absorptionen der Lösungsmittelbanden mehr als fünf Größenordnungen über den Amplituden der langlebigen Signale liegen, ist die Basislinienverschiebung aufgrund einer mittleren Temperaturerhöhung von $0,04 \text{ K}$ plausibel.

Die breitbandigen Lösungsmittelsignale erklären jedoch nicht die Abweichungen zwischen dem *trans* \rightarrow *cis*-Differenzsignal und der schmalbandigen Struktur der langlebigen Komponente. Diese Unterschiede werden besonders deutlich, wenn man die Spektren des ausbleichkorrigierten Produkts (Abb. 6.14(b), S. 176) mit dem *cis*-Absorptionsspektrum im photostationären Gleichgewicht (Abb. 6.11(a), S. 170) vergleicht. Vor allem im Bereich der Amid II-Bande erkennt man beim transienten Photoprodukt noch eine ausgeprägte Rotverschiebung, die im Gleichgewichtsspektrum nicht auftritt. Dies weist auf ein erwärmtes Molekül hin und kann mit dem Temperatursprung erklärt werden.

Der Anteil der Isomerisierung an den langlebigen Signalen kann aus den Gleichgewichtsspektren abgeschätzt werden indem das *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektrum der photostationären Gleichgewichte entsprechend der Anzahl der angeregter Moleküle in den transienten Spektren skaliert wird. Der Anteil angeregter Moleküle wiederum kann aus dem Verhältnis zwischen dem Grundzustandsbleichsignal am Zeitnullpunkt und dem Absorptionsspektrum der Probe bestimmt werden. Wegen der störenden kohärenten Effekte um $t = 0 \text{ ps}$ wird hier jedoch das transiente Spektrum bei $t = 1 \text{ ps}$ zum Vergleich bzw. zur Bestimmung des korrekten Skalierungsfaktors herangezogen (Abb. 6.14(a)).

Die Abschätzung wird für den Amid II-Bereich durchgeführt, da hier ein großes Differenzsignal bei geringer spektraler Verschiebung die geringsten Unsicherheiten erwarten lässt. Aus den Dauerstrichspektren (Abb. 6.11, S. 170) entnimmt man die Werte für die Absorption des *trans*-Isomers: $A_{cw} = (120 \times 10^{-3})$ und das *cis* \rightarrow *trans*-Differenzsignal: $\Delta A_{cw} = -7 \times 10^{-3}$. Aus dem Eduktspektrum nach 1 ps erhält man für das Ausbleichsignal der Amid II-Bande: $A(1 \text{ ps}) = 0,35 \times 10^{-3}$. Mit diesen Werten ergibt sich direkt ein Skalierungsfaktor von $f \approx 0,3 \times 10^{-3}$ mit dem auf das maximale Amid II-Differenzsignal der transienten Spektren nach langen Verzögerungszeiten geschlossen werden kann: $\Delta A(\tau_4 = \infty) = f \times \Delta A_{cw} \approx -2 \times 10^{-5}$. Nun muss noch die Isomerisierungsquantenausbeute einbezogen werden, die kleiner ist, als der in den photostationären Differenzspektren gefundene Populationsunterschied zwischen dem *trans*- und dem *cis*-angereicherten Zu-

stand: Aus den transienten Spektren im sichtbaren Spektralbereich wird für die *trans* → *cis*-Isomerisierung eine obere Schranke von ca. 10 % bestimmt (S. 182), während sich der Anteil an *trans* beim photostationären *trans* → *cis*-Differenzspektrum um mehr als 60 % verringert hat. Dementsprechend sollten die isomerisierungsbedingten Differenzsignale in den transienten Spektren nur maximal 1/6 der Amplitude der photostationären Differenzspektren aufweisen, im Bereich der Amid II-Bande also ca. $3,5 \times 10^{-6}$. Das ist deutlich kleiner als die strukturierten Banden des zerfallassozierten Spektrums und nur etwa 1/3 der positiven Basislinienverschiebung im Bereich der verlässlichen referenzierten Messung unterhalb von 1600 cm^{-1} . Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass die Differenzsignale im DAS zu τ_4 überwiegend durch die Isomerisierung hervorgerufen werden.

Trotzdem ist zu bedenken, dass es sich um eine relativ grobe Abschätzung handelt: Da einerseits die Anpassung des Eduktspektrums mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist, könnte der Skalierungsfaktor um einige 10 % unterschätzt worden sein. Andererseits sind Werte um die 5 % für die *trans* → *cis*-Isomerisierungsquantenausbeute verschiedener substituierter Azobenzole publiziert worden [131], die Isomerisierungsquantenausbeute könnte hier also auch deutlich unter 10 % liegen.

Bei dieser Betrachtung bleibt der direkte Einfluss des Lösungsmittels unberücksichtigt: durch die elektronische Anregung ändert sich instantan die Elektronenkonfiguration und damit das Dipolmoment des Azoschalters. Die ebenfalls polaren Lösungsmittelmoleküle richten sich in der Folge neu aus, was zu einer Absenkung der elektronischen Energie des angeregten Zustands führt. Eine solche Umorientierung der Lösungsumgebung wird auch die Schwingungsfrequenzen beeinflussen, insbesondere da intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen bestehen [380]. Der Einfluss dieser Solvensrelaxation auf das Schwingungsspektrum kann derzeit nicht quantifiziert werden. Jedoch handelt es sich um einen sehr schnellen Prozess, der in DMSO nach einigen zehn Pikosekunden vollständig abgeklungen ist. Beispielsweise wurde für Coumarin 153 in DMSO gezeigt, dass die Umorientierung der Solvensmoleküle nach ca. 5 ps abgeschlossen ist [381].

Insgesamt ergibt sich also folgendes Bild der Reaktionsdynamik des *trans*-Azoschalters:

- Nach der Anregung bei 350 nm in den $S_2(\pi\pi^*)$ -Zustand erfolgt die intramolekulare Schwingungsenergieumverteilung und die elektronische Relaxation in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand innerhalb einer Pikosekunde. Diese Vorgänge werden experimentell nicht aufgelöst.
- Die instantan auftretende Rotverschiebung kann der Absorption aus dem elektronisch angeregten Zustand zugeschrieben werden. Messungen im sichtbaren Spektralbereich ergeben einen biexponentiellen Zerfall des angeregten Zustands mit Zeitkonstanten von 0,4 ps und 4,7 ps.
- Die Umverteilung der Überschussenergie führt zur Erhöhung der molekularen Temperatur, was mit einer verzögerten Rotverschiebung der Schwingungsbanden einhergeht. Die Komponente $\tau_1 = 1,4 \text{ ps}$ der globalen Analyse wird diesem Prozess zugeordnet.

- Das Abklingen der dominanten Signale entspricht im Wesentlichen der Repopulation des elektronischen Grundzustands. Dies wird überlagert von einer spektralen Verschiebung der Differenzbanden auf vergleichbarer Zeitskala infolge der Schwingungsenergieumverteilung an die Lösungsmittelumgebung (Kühlen). Die beiden Prozesse lassen sich spektral und zeitlich nicht trennen und werden durch die Komponenten $\tau_2 = 5,6$ ps und $\tau_3 = 9,3$ ps modelliert.
- Die Umverteilung der gesamten Anregungsenergie im angeregte Probenvolumen ergibt eine abgeschätzte mittlere Temperaturerhöhung von $\Delta T \approx 0,04$ K.
- Das bei langen Verzögerungszeiten beobachtete, konstante Differenzsignal basiert im Wesentlichen auf dem Temperatursprung, den der Anregungspuls in der Probe induziert. Die Bildung des *cis*-Isomers kann nicht eindeutig nachgewiesen werden.
- Aus den Experimenten im sichtbaren Spektralbereich konnte eine Obergrenze von etwa 10 % für die *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierungsquantenausbeute abgeschätzt werden, was mit den Messungen im IR übereinstimmt.

Anisotropiemessungen

Alle Messungen am Azoschalter wurden polarisationsabhängig mit unterschiedlichen relativen Orientierungen von Anreg- und Abtastlicht durchgeführt: parallel, senkrecht und $\theta = 54,7^\circ$ (magischer Winkel). Mit der computergesteuerten Rotationseinheit (Abschnitt 3.1.4, S. 47) wurde die Polarisation des Anregungsstrahls während der Messung für alle drei Winkel eingestellt, somit ist die optimale Vergleichbarkeit der drei Datensätze gewährleistet. In Abbildung 6.18 sind Transienten der drei Datensätze sowie des nach Gleichung 3.17 (S. 61) berechneten Signals für den magischen Winkel dargestellt. Die gute Übereinstimmung der berechneten mit den gemessenen Daten zeigt die Präzision der Messung und die korrekte Einstellung der Polarisationen.

Die Herleitung des Anisotropieparameters r und seine Interpretation wurde bereits im Abschnitt 3.2.3 (S. 60) dieser Arbeit präsentiert. Aus der Anisotropie können prinzipiell Informationen über die relative Ausrichtung der Übergangsdipolmomente der angeregten und abgetasteten Übergänge abgeleitet werden. Somit lassen sich Rückschlüsse auf die Molekülgeometrie ziehen. Aus der zeitlichen Änderung der Anisotropie ergeben sich entsprechend zusätzliche strukturelle Informationen über die molekulare Dynamik.

Die Auswertung ist streng genommen nur für isolierte positive oder negative Differenzbanden erlaubt. Im Fall der Überlagerung von Signalen mit unterschiedlichen Vorzeichen oder bei Transienten, die Nullstellen aufweisen, ist eine Auswertung nicht sinnvoll bzw. der Anisotropieparameter nicht definiert. Deshalb sind bei der Auswertung einige Randbedingungen zu beachten:

- Bei langen Verzögerungszeiten ergeben sich sehr kleine Differenzsignale im Bereich der experimentellen Auflösung. Eine Auswertung der Anisotropie ist hier wegen des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht sinnvoll.

- Die Überlagerung positiver und negativer Signale mit unterschiedlicher Zeitabhängigkeit führt zu Transienten mit Nulldurchgängen, die keine Auswertung erlauben.
- Nulldurchgänge treten auch bei Kanälen auf, auf denen die spektrale Verschiebung der Differenzsignale dominiert (vgl. Abb. 6.16(b)), auch hier kann die Anisotropie nicht ausgewertet werden.
- Für die Interpretation muss auf allen Transienten geprüft werden, ob diese einem einzelnen Zustand zugeordnet werden können oder ob sie aus der Überlagerung unterschiedlicher Signale – mit unterschiedlicher Polarisationsabhängigkeit – bestehen. Wie in Abb. 6.14(a) auf Seite 176 gezeigt wurde, ist nahezu im gesamten Spektralbereich von einer Überlagerung auszugehen.

Theoretisch ließe sich für jede Polarisation und jede Verzögerungszeit aus den Differenzspektren das Edukt- und Produktspektrum errechnen. Die überlagerten positiven und negativen Beiträge könnten so separiert und getrennt ausgewertet werden, was auch die uneingeschränkte Berechnung der Anisotropie erlauben würde. Aus dieser Vorgehensweise würden sich jedoch neue, hier nicht kontrollierbare Fehlerquellen ergeben wie z. B. die nur ungenau mögliche Skalierung der Eduktspektren. Aufgrund dieser Unsicherheiten ist eine derartige Korrektur allein mit den vorliegenden Daten nicht durchführbar.

Ziel war es, eine umfassende globale Auswertung und den direkten Vergleich mit der Untersuchung der *cis* → *trans*-Isomerisierung zu ermöglichen. Daher wurden zunächst sämtliche Berechnungen für die Datensätze beider Isomere durchgeführt und bewertet: Die erhaltenen Anisotropieparameter $r(\tilde{\nu}, t)$ zeigen innerhalb der ersten ca. 10 ps keine signifikante Zeitabhängigkeit, d. h. die ihre zeitlichen Änderungen sind kleiner oder gleich der statistischen Abweichungen (Abb. 6.18). Im Zeitbereich nach 10 ps zeigten sich starke Schwankungen der Werte wegen der geringen Signalamplituden sowie zum Teil auftretender Nulldurchgänge und es ergeben sich Werte für r außerhalb des Definitionsbereiches. Bei sehr kurzen Verzögerungszeiten entstehen wegen der kohärenten Effekte am Zeitnullpunkt ebenfalls starke Schwankungen.

Deswegen wurde die quantitative Analyse der Anisotropie auf den Zeitbereich zwischen 0,4 ps und 8 ps eingeschränkt. Der Wert des Anisotropieparameters r ist in diesem Zeitfenster praktisch konstant, daher wurde für jede Wellenzahl aus den Einzelwerten der Mittelwert und dessen Fehler berechnet. Es wurden alle Kanäle verworfen, deren gemittelter Anisotropieparameter einen Fehler von $\Delta\langle r \rangle$ aufweist.

Trägt man die gültigen Werte gegen ihre Wellenzahl auf, ergibt sich die in Abbildung 6.18(a) dargestellte spektrale Abhängigkeit der Anisotropie (*Anisotropiespektrum*). Es zeigt sich, dass alle im Hinblick auf ihren Fehler als gültig angesehenen Werte auch innerhalb der Definitionsgrenzen des Anisotropieparameters liegen ($-0,2 \leq r \leq 0,4$). Zum Vergleich ist das transiente Differenzspektrum nach 1 ps eingefügt und die auswertbaren Bereiche sind farbig hinterlegt: ausgebleichte Grundzustandsbanden in blau und positive Produktbanden in gelb.

Im Anisotropiespektrum wird deutlich, dass die Werte innerhalb der einzelnen Banden im Differenzspektrum sehr ähnlich sind, während sie sich zwischen verschiedenen Banden

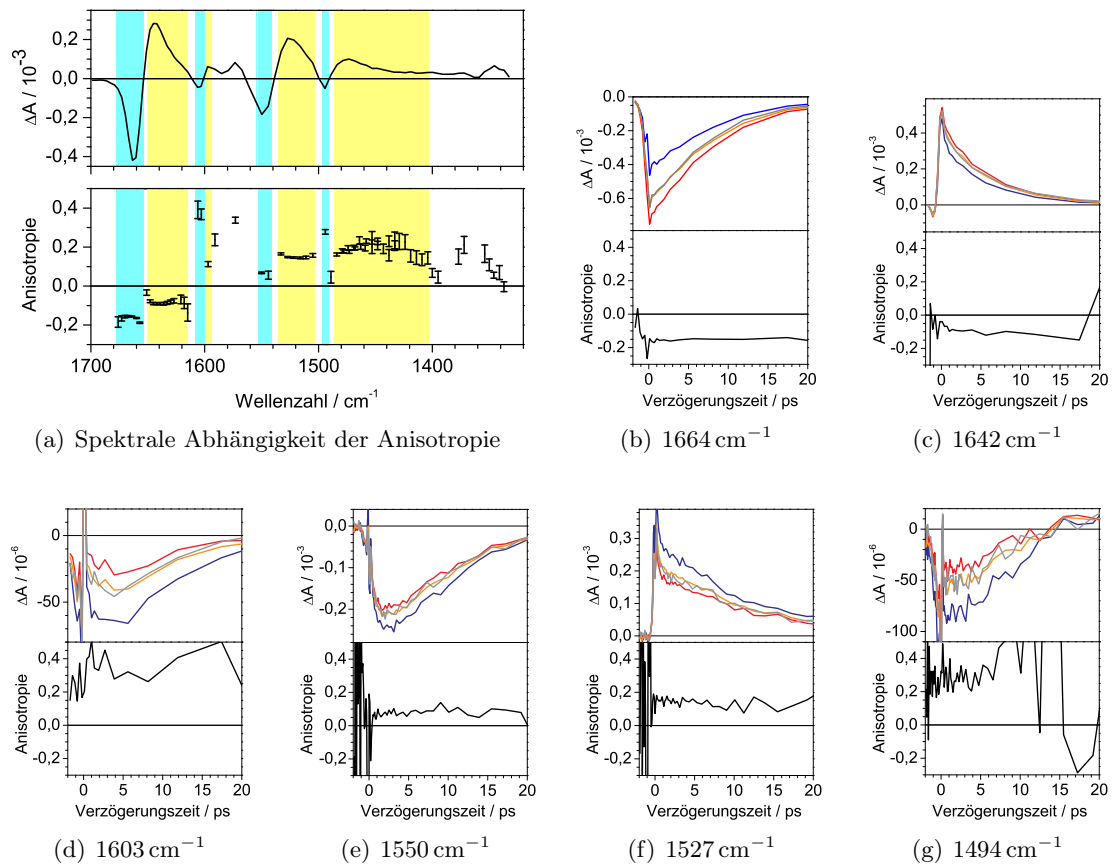


Abbildung 6.18: Azoschalter (*trans* \rightarrow *cis*): (a) Anisotropieparameter $\langle r \rangle$ gemittelt im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps im Vergleich zum transienten Spektrum (magischer Winkel) nach 1 ps: negative Differenzbanden sind in blau und positive in gelb hinterlegt.

(b)–(g) transiente Absorptionsänderungen und Anisotropieparameter r für ausgesuchte Kanäle im Zeitbereich von -2 ps bis 20 ps. Dargestellt sind die gemessenen Absorptionsänderungen für folgende Orientierungen von Anreg- und Abtastlicht: parallel (*blau*), senkrecht (*rot*), magischer Winkel (*grau*) sowie die aus parallel und senkrecht berechnete Absorptionsänderung für den magischen Winkel (*orange*).

Bande	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\langle r \rangle$	$\Delta\langle r \rangle$	$\langle \theta \rangle / ^\circ$	$\Delta\langle \theta \rangle / ^\circ$
Amid I	1664	-0,156	0,003	74,3	0,6
	1642	-0,091	0,006	64,8	0,8
Phenyl	1603	0,37	0,03	13	6
	1597	0,113	0,013	44	1,3
Amid II	1550	0,068	0,005	48,1	0,5
	1527	0,148	0,004	40,4	0,4
Phenyl	1494	0,278	0,012	27	1,4
	1473	0,176	0,008	37,7	0,8

Tabelle 6.4: Anisotropieparameter $\langle r \rangle$ des Azoschalters (*trans* \rightarrow *cis*), gemittelt im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps. Angegeben sind die Werte für die Extrema der Differenzbanden, die nach Gl. 3.18 (S. 61) berechneten Erwartungswerte des Winkels $\langle \theta \rangle$ und die Standardfehler der Mittelwerte.

unterscheiden. Dies gilt insbesondere auch für die positiven und negativen Differenzbanden, die derselben Schwingung zugeordnet werden können. Das bedeutet, dass die nach der Anregung rotverschoben absorbierenden Schwingungsmoden nicht dieselbe Anisotropie aufweisen, wie die des Grundzustandes vor der Absorption. Das kann als räumliche Umorientierung der beteiligten Gruppen nach der Anregung oder als eine andere Verteilung der Strukturen interpretiert werden.

Gerade bei der Betrachtung von Schwingungszuständen müssen die Flexibilität der Moleküle und deren möglicherweise vielfältige Konformationen beachtet werden. Die durchgeführte Ensemblemessung erlaubt keine Rückschlüsse auf die Geometrie einzelner Moleküle, folglich ergibt sich nur der Erwartungswert der Winkel aber keine Information über die Breite ihrer Verteilung: Beispielsweise entspricht ein Anisotropiewert von $r = 0$ einem Winkel von $\theta = 54,7^\circ$. In dem Fall könnten beide Dipolmomente im Molekül tatsächlich in diesem Winkel stehen, oder es liegt eine vollkommen isotrope Verteilung vor bei der alle Winkel mit gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten. Insofern sind konkrete Aussagen nur für die Extremfälle paralleler ($r = 0,4$) oder senkrechter ($r = -0,2$) Orientierung möglich. Tabelle 6.4 fasst die Werte für die Minima (Maxima) der negativen (positiven) Differenzbanden zusammen. Die Fehler wurden aus der Verteilung der Einzelwerte abgeleitet, sie repräsentieren im Wesentlichen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf den jeweiligen Wellenzahlen und nicht die Genauigkeit der Winkelmessung. Alle zuvor genannten systematischen Fehler der Methode bleiben davon unberührt.

Im Kombination mit quantenchemischen Rechnungen lassen sich die experimentell bestimmten Anisotropieinformationen hervorragend nutzen, um die Strukturmodelle zu verifizieren, bzw. eine vorhandene Bandenzuordnung anhand der experimentell bestimmten Winkeln überprüfen. Dabei wird das Übergangsdipolmoment für das sichtbare Anregungslicht bereits bei der Geometrieoptimierung direkt ausgegeben und kann ansonsten – zumindest grob – aus der Betrachtung der Molekülorbitale und Symmetrien abgeleitet werden. Für die Infrarotübergänge liegen im Allgemeinen keine derartigen

Informationen vor und falls es sich nicht um lokale Moden sondern um Gruppenschwingungen handelt, dann ist die Bestimmung des Übergangsdipolmoments nicht trivial. Mit Hilfe der durchgeführten Geometrieoptimierung und Normalmodenanalyse kann es jedoch zumindest näherungsweise abgeleitet werden: Für jede Schwingung sind die Koordinaten aller Atome sowie die Richtungen und Amplituden ihrer Auslenkung bekannt. Multipliziert man die Verschiebungsvektoren einer Normalmode mit den Partialladungen der Atome, dann erhält man die Änderung der Ladungsverteilung durch die Schwingung und somit auch ihr Dipolmoment. Eine derartige Rechnung wird zur Zeit von PD Markus Braun durchgeführt, diese wird eine tiefere Interpretation der experimentellen Daten erlauben.

Eine vorläufige Analyse kann anhand der Amid I-Bande durchgeführt werden. Diese Mode entspricht weitgehend der C=O-Streckschwingung, so dass die Lage des zugehörigen Übergangsdipolmoments in erster Näherung durch die Verbindungslinie dieser beiden Atome gegeben ist. Ebenso erscheint die Annahme gerechtfertigt, dass das Übergangsdipolmoment für die elektronische Anregung des *trans*-Isomers in der Ebene der Phenylringe liegt und mit der Hauptachse der chromophoren Azobenzol-Untereinheit zusammenfällt [27, 42, 308]. Unter diesen Annahmen stimmt der Winkel zwischen den Übergangsmomenten gut mit dem aus der Anisotropie ermittelten Wert von $\langle\theta\rangle = 74,3^\circ$ überein (vgl. Abb. 6.8(a), S. 164).

Zum vollständigen Verständnis der Anisotropieinformation sind noch weitere Arbeiten notwendig, die über die Zielsetzung dieser Dissertation hinausgehen. Vor allem gilt es die Unterschiede zwischen den negativen und positiven Differenzbanden der einzelnen Schwingungsmoden zu erklären. Die Korrelation der Anisotropieparameter innerhalb der Banden gibt keinen Hinweis darauf, dass die Werte durch sich überlagernde Signale stark beeinflusst sind. Alle Banden zeigen nach der Anregung Winkeländerungen von mindestens 8° . Aufgrund der geringen Isomeresierungsquantenausbeute kann eine Konfigurationsänderung diese großen Effekte nicht erklären. Die Annahme, dass die Elektronenkonfiguration im elektronisch angeregten Zustand zu einem geänderten Kraftfeld und anderen Partialladungen führt, könnte geänderte IR-Übergangsmomente erklären. Nach dem Übergang in den Grundzustand wäre jedoch wiederum eine Änderung der Anisotropie zu erwarten, was nicht nachzuweisen ist. Mit derselben Überlegung kann auch die Population des heißen Grundzustands als alleinige Ursache ausgeschlossen werden. Möglicherweise spielen auch ganz andere Prozesse eine Rolle. So könnten die Azoschalter im elektronisch angeregten Zustand zu nichtlinearen optischen Effekten in der Probe wie z. B. optischer Aktivität führen und die Polarisation des Abtaststrahls beeinflussen [41].

6.5.4 Transiente IR-Differenzspektren der *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung

Vorbemerkungen

Es wurde derselbe Spektralbereich wie bei der *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung (1330 cm^{-1} – 1700 cm^{-1}) untersucht. Dieser wurde mit insgesamt vier Messungen abgedeckt: für Wellenzahlen kleiner gleich 1470 cm^{-1} wurde Gitter 3 ($d = 75/\text{mm}$) eingesetzt, ansonsten

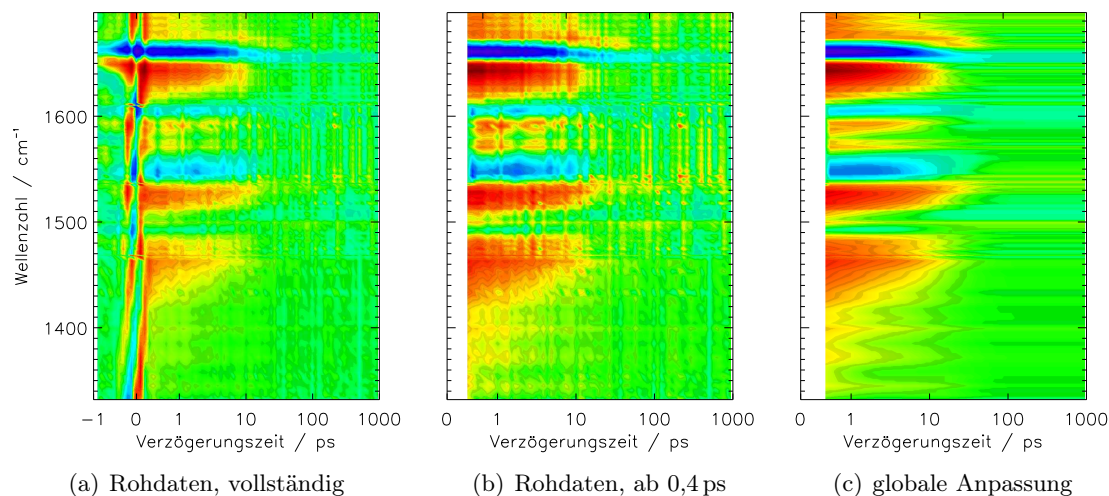


Abbildung 6.19: Transiente Absorptionsänderung des Azoschalters nach Anregung bei 425 nm (*cis* → *trans*) bestehend aus vier Einzelmessungen mit Abtastung im magischen Winkel. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. In (a) ist die PFID-Signatur vor dem Zeitnullpunkt sowie die um den Zeitnullpunkt dominierende Kreuzphasenmodulation deutlich zu erkennen. In Abb. (b) wird der Zeitbereich ab 0,4 ps dargestellt, was zu einer etwas besseren Farbskala führt. Im Zeitbereich von 0,5 ps bis 1,8 ns wurde eine globale Fitanalyse durchgeführt. (c) zeigt das Ergebnis für die Anpassung mit 4 exponentiellen Zerfallsfunktionen.

Gitter 2 ($d = 150/\text{mm}$). Die Daten wurden ebenfalls für die drei Polarisationsorientierungen parallel, senkrecht und magischer Winkel im referenzierten Modus erfasst.

Angeregt wurde mit der SFG bei 425 nm mit 600 nJ Pulsenergie. Die Verwendung so hoher Pulsenergien war nötig, da die $S_1(n\pi^*)$ -Bande des *cis*-Azoschalters nur eine geringe Absorption aufweist. Eine höhere Probenkonzentration kam hingegen nicht in Frage, da bei erhöhter Absorption des Abtastlichtes das Signal-zu-Rausch-Verhältnis sinken würde. Es ist nicht möglich, das reine *cis*-Isomer durch Belichtung im photostationären Gleichgewicht zu präparieren, unter den vorliegenden Bedingungen sind ca. 10 % bis 15 % der angeregten Moleküle in der *trans*-Konfiguration (vgl. Tab. 6.2, S. 169).

Der Zeitbereich der Messung und die Korrektur des Zeitnullpunktes sowie die folgende Verarbeitung, Auswertung und Darstellung der Daten ist identisch zu Untersuchung der *trans* → *cis*-Isomerisierung. Dies wurde ab Seite 172 ausführlich beschrieben und soll hier nicht wiederholt werden.

Ergebnisse der fs-IR-Messungen

In Abbildung 6.19 wird die Übersicht der transienten Absorptionsänderungen nach Anregung des *cis*-Isomers in der $S_1(n\pi^*)$ -Bande dargestellt. Es zeigt sich eine große Ähnlichkeit mit den Ergebnissen nach Anregung des *trans*-Azoschalters (Abb. 6.12, S. 174). Dies entspricht auch der Erwartung, da die wesentlichen Merkmale der IR-Absorptionsspektren unabhängig von der Konfiguration sind und die Photoanregung zu

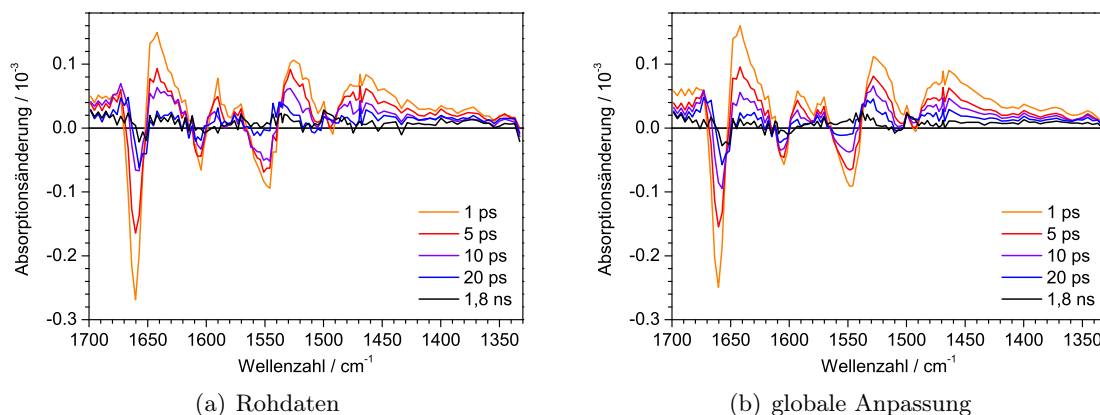


Abbildung 6.20: Transiente Differenzspektren des Azoschalters (*cis* → *trans*) zu ausgewählten Verzögerungszeiten. In (a) sind die unverarbeiteten Daten dargestellt. Zum Vergleich sind in (b) dieselben Spektren nach der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten gegeben.

vergleichbaren Effekten führen sollte. Auf eine erneute ausführlichen Beschreibung wird verzichtet, statt dessen werden nur die wichtigsten Merkmale kurz zusammengefasst. Insgesamt bleibt festzustellen, dass die transienten Absorptionsänderungen und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei dieser Messreihe geringer sind.

Die auftretenden Effekte lassen sich nach ihrer zeitlichen Abfolge wie folgt gliedern: 1. vor dem Zeitnullpunkt: gestörter freier Induktionszerfall, 2. um den Zeitnullpunkt: Störung durch die Kreuzphasenmodulation, 3. nach dem Zeitnullpunkt: Reaktion der Schwingungsmoden auf die elektronische Anregung. Es tritt wieder bei allen beobachteten Schwingungsbanden, außer der C–H₂-Bande bei 1356 cm^{-1} , eine Rotverschiebung auf. Dieses instantan erscheinende Signal zerfällt auf der Zeitskala von etwa 10 ps und entspricht in der spektralen Signatur in erster Näherung der Anregung des *trans*-Isomers. Nach langen Verzögerungszeiten tritt das konstante Differenzspektrum einer langlebigen Spezies auf.

Abbildung 6.20 zeigt ausgewählte transiente Differenzspektren. In diesen erkennt man den Zerfall der instantanen Differenzsignale, aber es werden auch einige Unterschiede zur Messung am *trans*-Isomer deutlich:

- Die langlebigen Signale sind deutlich ausgeprägter als nach Anregung der *trans*-Isomere.
- Im Spektralbereich oberhalb von 1670 cm^{-1} ergibt sich eine positive Absorptionsänderung, die mit ca. 10 ps zerfällt und zuvor nicht beobachtet wurde.
- Das Bleichsignal der Amid I-Bande entspricht nicht exakt dem Signal vor dem Zeitnullpunkt und erscheint zudem schmäler als bei der Messung der *trans*-Konfiguration. Auch die Zeitabhängigkeit der Bande ist eine andere.

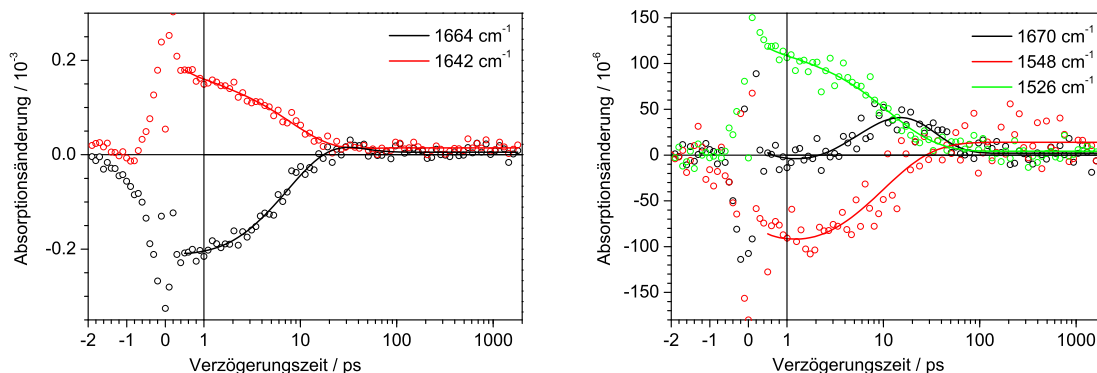


Abbildung 6.21: Transienten des Azoschalters (*cis* → *trans*) bei ausgewählten Wellenzahlen. Die einzelnen Signale wurden entsprechend ihrer Amplitude in zwei getrennten Diagrammen dargestellt. Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten als Linie dargestellt. Das Signal bei 1670 cm^{-1} tritt bei der Messung der *trans* → *cis*-Isomerisierung nicht auf.

- Das Signal der Kreuzphasenmodulation ist hier wesentlich stärker ausgeprägt, was durch die höhere Intensität des Anregungslichts bedingt ist. Aufgrund der niedrigen Absorption in der $S_1(n\pi^*)$ -Bande des *cis*-Isomers sind die Signale der Probe trotzdem kleiner als die des *trans*-Isomers.
- Die zeitabhängige Verschiebung in der Amid II-Region ist weniger ausgeprägt, das Differenzsignal bei 1356 cm^{-1} ist nicht mehr nachweisbar.
- Das Bleichsignal der Amid II-Bande verschwindet nach ca. 50 ps.

Zusätzlich zu den Signalen der Probe ist eine Störung zu erkennen: den Differenzspektren ist im Bereich von 1470 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} ein alternierendes Signal mit einer Amplitude von ca. 5×10^{-6} überlagert. Dieses Artefakt wird nahezu unverändert zu allen Verzögerungszeitpunkten beobachtet, es ist also von einem systematischen Fehler auszugehen. Die Ursache konnte auf die Verstärkerelektronik eingegrenzt werden. Vermutlich beeinflusste das große Signal der Photodiode im Anregungsstrahlengang das Massepotential der angeschlossenen Verstärkerplatine synchron mit der Anregung. Jedes zweite Element einer Detektorzeile wird ebenfalls auf dieser Platine verstärkt, so dass es über das Massepotential zu einem Übersprechen der Kanäle kommen kann, welches mit der Anregung synchronisiert ist. Nach dem Austausch der Photodiode ist dieser Effekt in späteren Messreihen nicht mehr aufgetreten.

Globale Fitanalyse

Die große Ähnlichkeit der transienten Differenzspektren beider Isomere zeigt, dass dieselben Prozesse auftreten, was durch die globale Analyse im Prinzip bestätigt wird. Jedoch ergeben sich im Detail einige Unterschiede, deren Ursachen nicht eindeutig zu klären sind.

Das höhere Rauschen des Datensatzes führt zu einer relativ großen Unsicherheit der globalen Anpassung und der daraus resultierenden Zeitkonstanten. Entsprechend sind auch die zerfallassozierten Spektren deutlich verrauschter als die des *trans*-Isomers, so dass auch deren Zuordnung und Interpretation beeinträchtigt sind.

Die Frage nach der Anzahl der Zeitkonstanten der globalen Anpassung kann nicht eindeutig beantwortet werden. Nimmt man einen monoexponentiellen Zerfall an, wählt also eine Anpassung mit zwei Zeitkonstanten von denen eine auf den Wert $\tau_2 := \infty$ festgelegt wurde, dann erhält man: $\tau_1 = 8,7$ ps. In erster Näherung ergeben sich also keine wesentlichen Unterschiede zum *trans*-Isomer ($\tau = 7,9$ ps). Bei Verwendung von drei Zeitkonstanten ergibt sich $\tau_1 = 6,9$ ps, $\tau_2 = 18$ ps und $\tau_3 := \infty$. Dabei zeigen sich praktisch nur noch innerhalb der ersten Pikosekunden Abweichungen der Kurve von den Messwerten. Da in diesem Zeitbereich nur wenige Messwerte zur Anpassung der Kurven zur Verfügung stehen kann dieser Befund allein noch nicht als signifikant für eine unzureichende Modellierung der Daten angesehen werden. Bei Verwendung von vier Komponenten erhält man: $\tau_1 = 0,7$ ps, $\tau_2 = 8,3$ ps, $\tau_3 = 20$ ps und $\tau_4 := \infty$. Damit werden die Signale im Bereich um 1 ps besser angepasst und die Werte stimmen im Rahmen der Analysegenauigkeit mit denen für die *trans*-Konfiguration überein. Abbildung 6.21 zeigt die angepassten Kurven zusammen mit den transienten Absorptionsänderungen ausgewählter Wellenzahlen.

Im Vergleich zu der globalen Analyse der transienten Differenzspektren des *trans*-Isomers ist der Wert der kürzesten Zeitkonstanten halbiert. Da die Analyse im Zeitbereich $t \geq 0,5$ ps durchgeführt wird, ist Anpassung dieser Komponente zwar mit einer großen Unsicherheit behaftet, trotzdem ist das zerfallassozierte Spektrum zu τ_1 eindeutig strukturiert. Es muss also davon ausgegangen werden, dass diese Komponente nicht allein auf die Beschreibung des kohärenten Artefaktes oder anderen Störgrößen zurückzuführen ist. Insgesamt erscheint die Verwendung von vier Zeitkonstanten also gerechtfertigt und wird im Folgenden als optimal angesehen und diskutiert.

In den 2d-Grafiken sowie in den transienten Spektren lässt sich gut erkennen, dass der Signalverlauf durch den Rückgang und die leichte spektrale Änderung der instantanen Rotverschiebung dominiert wird. Das wird durch τ_2 und τ_3 angepasst, deren Werte signifikant größer sind als die entsprechenden des *trans*-Isomers. Dies darf jedoch nicht überbewertet werden, da zwei Zerfallsfunktionen benötigt werden, um die unterschiedlich ausgeprägten spektralen Verschiebungen der Differenzbanden zu modellieren.

Interessanter ist der Vergleich der zerfallassozierten Spektren: Eine deutliche spektrale Verschiebung tritt diesmal im Bereich der Amid I-Mode auf, dies wird durch die nahezu spiegelbildlichen und leicht versetzten Spektren modelliert und führt so auch zu den sehr großen Amplituden in diesem Bereich. Umgekehrt ist es im Bereich der Amid II-Schwingungsmode: diese zeigt in der *cis*-Konfiguration weniger ausgeprägte spektrale Änderungen als in der *trans*-Konfiguration – die Spektren zu τ_2 und τ_3 zeigen eine versetzte Signatur, keine spiegelbildliche.

Das mit τ_1 assoziierte Spektrum ist nahezu im gesamten Spektralbereich positiv. Negative Banden treten nur im Bereich der Amid I- sowie einer Phenylmode auf (1660 cm^{-1} und 1600 cm^{-1}). Das entspricht dem Zerfall einer breitbandigen, unstrukturierten Ab-

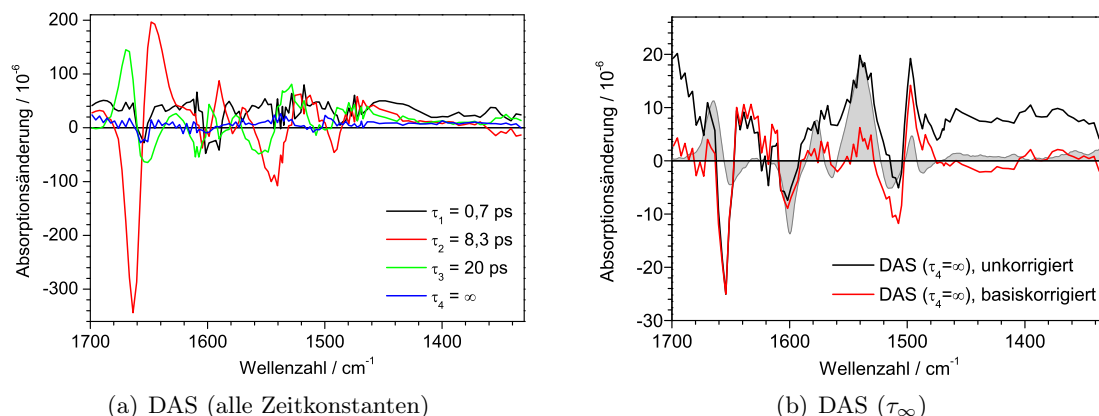


Abbildung 6.22: Zerfallsspektren des Azoschalters (*cis* \rightarrow *trans*) für die globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten (a). Die konstante Komponente ($\tau = \infty$) wird in (b) zusammen mit einem basislinienbereinigten Spektrum dargestellt (siehe Abschnitt 3.2.2, S. 57). Zum Vergleich ist das willkürlich skalierte *cis* \rightarrow *trans*-Differenzspektrum (Abb. 6.11(b), S. 170) in grau hinterlegt.

sorption zusammen mit dem Rückgang des Bleichsignals in diesen Banden, ist also nicht identisch mit dem zerfallsspektren zu τ_1 des *trans*-Isomers. Dieses Spektrum ist mit der größten Unsicherheit behaftet, so dass eine genauere Untersuchung hier nicht erfolgen kann.

Das zerfallsspektren zu τ_4 repräsentiert wieder eine langlebige Spezies. In Abbildung 6.22(b) ist es zusammen mit dem *cis* \rightarrow *trans*-Differenzspektrum der photostationären Gleichgewichte dargestellt. Im Vergleich zum *trans*-Isomer fällt die deutlich größere Amplitude auf. Trotzdem wird das *cis* \rightarrow *trans*-Differenzspektrum auch in diesem Fall nach 1,8 ns noch nicht erreicht auch wenn zum Teil Übereinstimmungen feststellbar sind. Im Vergleich zu den übrigen Signalen ist beispielsweise das residuale Bleichsignal im Amid I-Bereich überproportional groß und zudem spektral verschoben: es liegt bei der Wellenzahl des Nulldurchgangs im Gleichgewichtsdifferenzspektrum. Außerdem tritt wieder eine positive Basislinienverschiebung auf, die beim *trans*-Isomer einem Temperatursprung zugeordnet wurde. Das basislinienbereinigte Spektrum wird ebenfalls dargestellt. Allerdings muss hier von Artefakten im Bereich der Amid II-Bande ausgegangen werden, da dort die Grenzen zweier Messbereiche liegen, auf denen die Korrektur jeweils unabhängig durchgeführt wird.

Interpretation

Diese Messungen lassen sich ebenfalls auf Grundlage der für Azobenzol entwickelten Modellvorstellungen interpretieren. Es werden dieselben spektralen Charakteristika wie bei den Experimenten am *trans*-Azoschalter beobachtet, daher wird hier nur noch das daraus abgeleitete Reaktionsschema dargelegt und auf eine ausführliche Begründung verzichtet. Es sind folgende grundlegende Prozesse zu erwarten bzw. zu beobachten:

Die Anregung führt zu einer nicht-thermischen Besetzung des $S_1(n\pi^*)$ -Zustands, was mit einer instantanen Rotverschiebung der beobachteten Schwingungsmoden verbunden ist. Diese Population relaxiert (sub-ps) über intramolekulare Schwingungsenergieumverteilung, dabei heizt sich das Molekül auf. Die elektronische Deaktivierung läuft ebenfalls auf Pikosekundenzeitskala ab und führt entsprechend zu aufgeheizten Molekülen im elektronischen Grundzustand, wobei zum Teil die *trans*-Konfiguration gebildet wird.

Die Komponente $\tau_1 = 0,7$ ps beschreibt den Zerfall einer sehr breiten, unspezifischen Absorption und die Repopulation einiger Grundzustandsschwingungen. Dies kann mit einer schnellen Komponente des Zerfalls des $S_1(n\pi^*)$ -Zustands assoziiert sein. Die kürzere Lebensdauer angeregter Zustände nach der $S_1(n\pi^*)$ -Anregung von *cis*-Azobenzol im Vergleich zum $S_2(\pi\pi^*)$ -Übergang von *trans*-Azobenzol ist allgemein anerkannt. Entsprechend sind hier auch kürzere Zeitkonstanten für diese Prozesse zu erwarten.

Die heißen *trans*- und *cis*-Moleküle relaxieren mit einer Zeitkonstante von etwa 10 ps durch Schwingungsenergieumverteilung an die Lösungsumgebung. Dies führt zum Zerfall der Differenzbanden bei gleichzeitiger spektraler Veränderung und wird in der globalen Anpassung durch die Komponenten $\tau_2 = 8,3$ ps und $\tau_3 = 20$ ps modelliert. Dabei zeigt die Amid I-Bande deutlich eine transiente Rotverschiebung des Differenzsignals, was zu großen, sich teilweise kompensierenden Amplituden der zerfallassozierten Spektren in diesem Bereich führt. Die Amid II-Mode weist bei diesen Experimenten keine ausgeprägte spektrale Verschiebung auf.

Das bei langen Verzögerungszeiten konstante Signal wird durch das zerfallassozierte Spektrum zu $\tau_4 := \infty$ repräsentiert. Es kann überwiegend auf die Aufheizung des Lösungsmittels durch der Umverteilung der Anregungsenergie zurückgeführt werden. Die für eine solche Temperaturerhöhung charakteristische positive Basislinie liegt wieder bei etwa 10×10^{-6} . Die Amplituden der schmalbandigen Struktur sind im Vergleich zum *trans*-Isomer etwa verdoppelt, was mit dem Temperatursprung allein nicht zu erklären ist. Die Struktur ist zumindest teilweise auf die *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung zurückzuführen, wie der Vergleich mit dem mit dem Differenzspektrum der photostationären Zustände beweist. Eine bessere Übereinstimmung der Spektren ist nicht zu erwarten, da temperaturinduzierte spektrale Änderungen vergleichbarer Größe für die *cis*- und *trans*-Photoprodukte berücksichtigt werden müssen.

Aus der Amplitude der instantanen Signale lässt sich auch hier das maximal zu erwartende Differenzsignal aufgrund der *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung bestimmen. Bei einer lichtinduzierten Konzentrationsänderung des *cis*-Azoschalters von 90 %, analog der photostationären Gleichgewichte, ergibt sich ein Amid II-Differenzsignal von $\Delta A \approx 15 \times 10^{-6}$. Für die *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierungsquantenausbeute von Azobenzol in DMSO wurde ein Wert von ca. 30 % abgeschätzt [131], daraus folgt $\Delta A \approx 5 \times 10^{-6}$. Das entspricht in etwa den beobachteten Amplituden, wenn man einen Temperatureffekt berücksichtigt, wie er bei der Messung am *trans*-Azoschalter beobachtet wird. Die Fehlergrenzen für diese Abschätzung sind relativ hoch, so dass Werte im Bereich von etwa 20 % bis 50 % realistisch erscheinen.

Der Einfluss von teilweise angeregten *trans*-Isomeren kann in den transienten Spektren im Rahmen der Messgenauigkeit nicht nachgewiesen werden. Die spektralen Unterschiede

zwischen beiden Konfigurationen sind relativ gering und die Spektren werden durch die dominierenden Kühlprozesse in gleicher Weise beeinflusst. Ohne die Möglichkeit einer zuverlässigen Skalierung kann keine Separation des *cis*-Anteils in den Daten erfolgen.

Anisotropiemessungen

Die Auswertung der Anisotropie erfolgt analog zum *trans*-Isomer (vgl. Abschnitt 6.5.3, S. 186). Abbildung 6.23 zeigt das im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps gemittelte Anisotropiespektrum und Transienten ausgewählter Wellenzahlen. Im Spektrum sind nur die Werte dargestellt, für die $\Delta\langle r \rangle \leq 0,05$ gilt.

Das verschlechterte Signal-zu-Rausch-Verhältnis wirkt sich auch auf die Berechnung des Anisotropieparameters aus: Insbesondere im Bereich der Amid II-Bande schwanken die Werte stark. Trotzdem erkennt man wieder die Korrelation der Werte innerhalb der einzelnen Differenzbanden. In Tabelle 6.5 sind die Anisotropieparameter und die daraus berechneten Mittelwerte des Winkels θ zwischen den Übergangsdipolmomenten des sichtbaren Anregungs- und des infraroten Abtastlichtes für einige Banden zusammengestellt.

Das Ergebnis unterscheidet sich teilweise deutlich von dem der *trans*-Konfiguration. Für die *cis*-Konfiguration ergibt sich für das Signal der ausgebleichten (negativen) Amid I-Bande $\langle \theta \rangle = 83^\circ$ und für die positive Produktbande $\langle \theta \rangle = 56^\circ$. Für das *trans*-Isomer erhält man dagegen für die ausgebleichte Amid I-Bande $\langle \theta \rangle = 74,3^\circ$ und für die Produktbande $\langle \theta \rangle = 64,8^\circ$. Die aus den Bleichsignalen ermittelten unterschiedlichen Winkel für beide Konfigurationen entsprechen den verschiedenen Gleichgewichtsgeometrien von *cis*- und *trans*-Isomer.

Bemerkenswert ist der Effekt der Anregung auf die Amid I-Mode: der Winkel $\langle \theta \rangle$ ändert sich von nahezu senkrecht auf etwa 54° was sehr nahe am magischen Winkel liegt. Außerdem sind die Werte innerhalb der Produktbande nicht konstant, sie weisen einen Verlauf von nahezu isotrop bei 1642 cm^{-1} (Maximum der Differenzbande) zu etwa 42° ($r = 0,134$) bei 1624 cm^{-1} (niederenergetischen Flanke) auf. Die Interpretation ist nicht eindeutig. Entweder wird eine neue Konformation mit einem veränderten Winkel eingenommen oder die Anregung führt zu mehr Flexibilität, so dass eine nahezu isotrope Verteilung der Winkel resultiert. Möglicherweise gibt es innerhalb der inhomogen verbreiterten Produktbande einen Zusammenhang zwischen dem Winkel θ einer Schwingungsmode und ihrer Wellenzahl. Ein vergleichbarer Effekt tritt bei *trans* nicht auf: der Winkel ändert sich nur um etwa 10° , von etwa 74° auf 65° .

Es gibt verschiedene Ansätze zur Erklärung dieser Befunde, von denen die am wahrscheinlichsten erscheinenden aufgezählt werden:

- Die *cis*-Konfiguration des Azoschalters ist sterisch beansprucht, im angeregten Zustand und im heißen Grundzustand vergrößert sich der zugängliche Konformationsraum, die Verteilung der Winkel ist nahezu isotrop. In der *trans*-Konfiguration ist bereits vor der Anregung mehr Flexibilität vorhanden, da die Substituenten in *para*-Position sterisch nicht gehindert sind. Entsprechend wären die Auswirkungen der Anregung geringer. Im Amid II-Bereich unterscheiden sich beide Konfigurationen

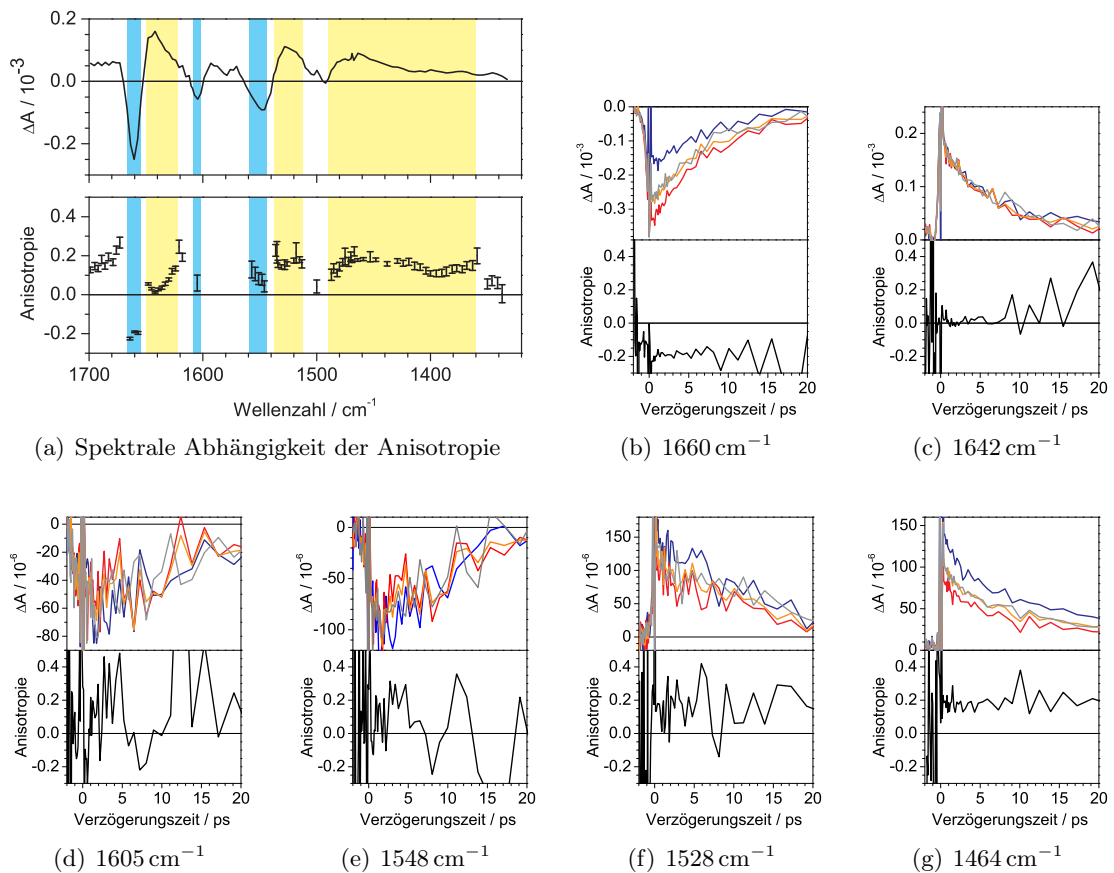


Abbildung 6.23: Azoschalter (*cis* \rightarrow *trans*): (a) Anisotropieparameter $\langle r \rangle$ gemittelt im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps im Vergleich zum transienten Spektrum (magischer Winkel) nach 1 ps: negative Differenzbanden sind in blau und positive in gelb hinterlegt.

(b)–(g) transiente Absorptionsänderungen und Anisotropieparameter r für ausgesuchte Kanäle im Zeitbereich von -2 ps bis 20 ps. Dargestellt sind die gemessenen Absorptionsänderungen für folgende Orientierungen von Anreg- und Abtastlicht: parallel (*blau*), senkrecht (*rot*), magischer Winkel (*grau*) sowie die aus parallel und senkrecht berechnete Absorptionsänderung für den magischen Winkel (*orange*).

Bande	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\langle r \rangle$	$\Delta\langle r \rangle$	$\langle \theta \rangle / ^\circ$	$\Delta\langle \theta \rangle / ^\circ$
Amid I	1660	-0,190	0,005	83	2
	1642	0,012	0,005	55,0	0,5
Phenyl	1605	0,06	0,04	49	4
Amid II	1548	0,08	0,03	47	3
	1528	0,154	0,004	39,8	0,4

Tabelle 6.5: Anisotropieparameter des Azoschalters (*cis* \rightarrow *trans*), gemittelt im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps. Angegeben sind die Werte für die Extrema der Differenzbanden, die gemäß Gl. 3.18 (S. 61) berechneten Erwartungswerte des Winkels θ und die Standardfehler der Mittelwerte.

allerdings nur unwesentlich. Beide Schwingungsmoden sind mit der Konformation der Peptidgruppe verknüpft, daher erscheint die Erklärung allein durch eine Geometrieänderung als zu einfach.

- Die nach der Photoanregung isomerisierten Moleküle unterscheiden sich in Geometrie und Anisotropiespektrum vom Ausgangszustand. Ihre Signatur überlagert die der nicht isomerisierten, was bei hohen Isomerisierungsquantenausbeute nach der $S_1(n\pi^*)$ -Anregung des *cis*-Isomers eine entscheidende Rolle spielt, während die $S_2(\pi\pi^*)$ -Anregung des *trans*-Azoschalters nicht signifikant zur Isomerisierung führt.
- Die Unterschiede in den Anisotropiespektren werden durch die geänderte elektronische Struktur der Moleküle nach der Absorption der Anregungsphotons verursacht. Diese unterscheiden sich natürlich, da beim *trans*-Isomer der $S_2(\pi\pi^*)$ -Übergang und beim *cis*-Isomer der $S_1(n\pi^*)$ -Übergang angeregt wurde. Zumindest diese Möglichkeit könnte verifiziert werden indem man die Anisotropie von $S_2(\pi\pi^*)$ - und $S_1(n\pi^*)$ -Anregung derselben Konfiguration vergleicht – was aber nicht Zielsetzung dieser Arbeit ist.

Vermutlich spielen alle genannten Effekte eine Rolle und sind nicht isoliert zu betrachten. Zu einem besseren Verständnis könnten die Messungen im relevanten Zeitbereich mit kleinerer Schrittweite wiederholt werden, um eine bessere Auflösung zu erhalten und so die Basis für Interpretationen zu festigen. Zudem wären sowohl quantenchemische Rechnungen als auch Molekulardynamiksimulationen hilfreich. Damit könnte das Bild vom zugänglichen Konformationsraum der Isomere verfeinert und die Flexibilität des Moleküls verfolgt werden. Für ausgewählte Konformationen könnten dann die Übergangsdipolmomente berechnet und die so errechneten Anisotropieparameter mit den gemessenen Werten verglichen werden.

6.6 Die photoschaltbare Collagen-Tripelhelix

Die Struktur des synthetischen Modellpeptids und das Prinzip der lichtinduzierten Entfaltung wird in der Einleitung dieses Kapitels erläutert (Abb. 6.5, S. 162). Die Bildung der Tripelhelix und die lichtgesteuerte Modulation des Anteils an Monomeren wurde mit NMR-Spektroskopie bereits nachgewiesen [373]. Es wurde festgestellt, dass die Temperatur der Probe sowohl die Lage des photostationären *cis/trans*-Gleichgewichtes der Azoschalter als auch die Ausbeute an entfalteten Monomeren beeinflusst. Daraus wurde gefolgert, dass erst eine thermisch destabilisierte Collagen-Tripelhelix die effektive lichtinduzierte Entfaltung ermöglicht. Die vorliegenden temperaturabhängigen CD- sowie Absorptions- und Differenzspektren im sichtbaren und infraroten Spektralbereich wurden ebenfalls mit diesem Modell erklärt [375]. Danach soll die lichtinduzierte Entfaltung bei 50 °C mit hoher Effizienz erfolgen, da diese Temperatur knapp unterhalb des Schmelzpunktes liegt und deswegen eine thermisch destabilisierte Tripelhelix vorliegt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen bei verschiedenen Temperaturen konnten mit diesem Reaktionsmodell jedoch nicht befriedigend erklärt werden. Entsprechend wurden die Spektren, die von L. Lorenz gemessen und zur Verfügung gestellt wurden [375], erneut ausgewertet und interpretiert. Besonderes Augenmerk wurde auf den H/D-Austausch des Azocollagens in EG-*d*₆:D₂O gelegt, mit dem sich die temperaturinduzierten irreversiblen Änderungen des IR-Absorptionsspektrums nun erstmals konsistent erklären lassen.

Für das Verständnis der Daten ist eine umfangreiche Charakterisierung sowohl im sichtbaren als auch im infraroten Spektralbereich essentiell. Dabei soll eine möglichst vollständige Bandenzuordnung vorgenommen werden. Außerdem muss der Einfluss der Temperatur auf die Spektren der Probe und des Lösungsmittels bestimmt werden. Zuerst werden daher die Ergebnisse der statischen Messungen und ihre Interpretation präsentiert. Im Anschluss werden die zeitaufgelösten IR-Differenzspektren des Azocollagens bei verschiedenen Temperaturen vorgestellt.

Experimentelle Bedingungen

Die Absorptionsspektren im UV/vis-Bereich wurden in einem Zweistrahlenspektrometer der Firma JASCO aufgenommen (JASCO V 670, mit Peltier JASCO-ETC-717). Die benutzten Quarzglaszküvetten haben eine Schichtdicke von 1 mm, die verwendeten Konzentrationen lagen im Bereich von 0,2 mM bis 0,4 mM bezogen auf die Monomere. Das entspricht einer Absorption zwischen 0,5 und 1,0 bei 330 nm im Bereich der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande der *trans*-Azoschalter.

Zur Aufnahme der Infrarotspektren wurde ein FTIR-Spektrometer vom Typ Vector 22 der Firma Bruker verwendet. Es besitzt einen automatischen Probenschlitten mit temperierbarem Probenhalter und der Möglichkeit zur Probenbelichtung. Parallel zur Azocollagenprobe wurde das Spektrum einer mit Lösungsmittel gefüllten Referenzküvette unter identischen Bedingungen gemessen. Die eingesetzte CaF₂-Transmissionsküvette hat eine Schichtdicke von 50 μ m, genauso wie die Rotationsküvette. Die Probenkonzentration

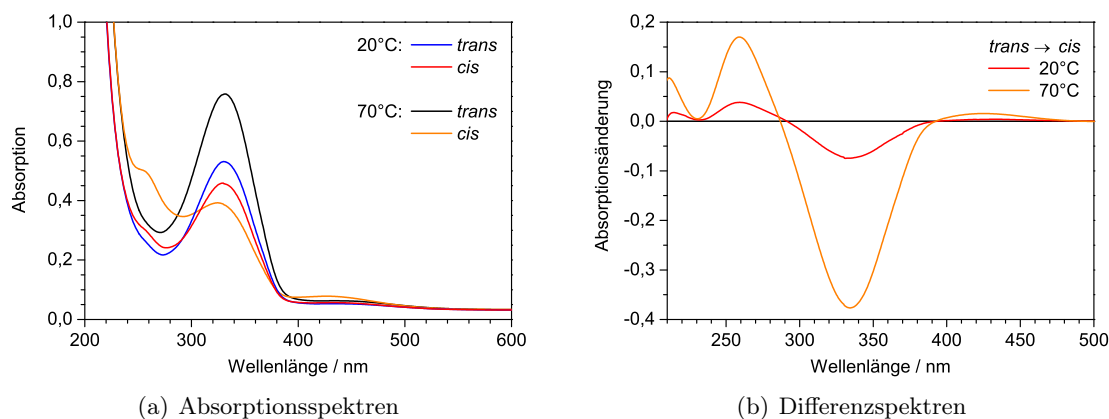


Abbildung 6.24: UV/vis-Absorptions- und Differenzspektren der photostationären Zustände des Azocollagens bei 20°C und 70°C. Die Temperaturerhöhung führt zu einer stärkeren Absorption der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande der *trans*-Form und dementsprechend größeren *trans* → *cis*-Differenzamplituden. Auffällig ist jedoch, dass die Flanke bei 220 nm unabhängig von der Konfiguration um etwa 10 nm rotverschoben ist.

lag bei allen Messungen im infraroten Spektralbereich in der Größenordnung von 10 mM bezogen auf die Monomere. Das führt zu einer Absorption von etwa 1 bei 330 nm in der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande bzw. von etwa 0,6 bei 1660 cm^{-1} in der Amid I-Bande der Azoschalter in der *trans*-Konfiguration.

Die Einstellung photostationärer Gleichgewichtszustände erfolgte wie in Abschnitt 6.5.1 auf Seite 165 beschrieben. Um die Degeneration der Probe durch die Dauerbelichtung zu minimieren wurde das UV-Licht durch einen zusätzlichen Neutralglasfilter ($OD = 1,0$) abgeschwächt.

Zeitaufgelöste IR-Differenzspektren wurden bei verschiedenen Temperaturen nur im *trans*-angereicherten photostationären Gleichgewicht aufgenommen. Die Probe wurde mit der Temperatureinheit der Rotationsküvette (Abschnitt 3.1.4, S. 46) elektrisch erwärmt.

Die temperaturabhängigen Absorptionsspektren der photostationären Gleichgewichtszustände des Azocollagens wurden von L. Lorenz in ihrer Doktorarbeit gemessen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die dabei angewendete Software zur automatisierten Aufnahme temperaturabhängiger FTIR-Spektren wurde von Carsten Krejtschi während seiner Promotion entwickelt. Weitere Details finden sich in den beiden Dissertationen [59, 375].

6.6.1 Charakterisierung im sichtbaren Spektralbereich

Die Absorptionsspektren der photostationären Gleichgewichte des Azocollagens sind in Abbildung 6.24(a) dargestellt, es wurde keine Streulichtkorrektur vorgenommen. Sie ähneln denen des isolierten Schalters (vgl. Abb. 6.9, S. 166) und zeigen somit die typische Bandensignatur der Azobenzol-Typen. Das Maximum der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande der *trans*-Konfiguration liegt bei 330 nm, das der $S_1(n\pi^*)$ -Bande der *cis*-Konfiguration

bei 425 nm. In diesem Bereich ist kein Einfluss der Collagen-Sequenz erkennbar. Die Absorptionseigenschaften des Chromophors werden offensichtlich durch die Ankopplung an die Peptidstränge sowie durch den Wechsel des Lösungsmittels nur wenig beeinflusst.

Die Bande unterhalb von 240 nm kann den ($n\pi^*$)- und ($\pi\pi^*$)-Übergängen der Peptidgruppen der Collagene zugeordnet werden, diese tritt beim isolierten Azoschalter nicht auf. Die Struktur und das Maximum dieser Absorptionsbande kann bei der vorliegenden Konzentration nicht bestimmt werden.

Die bei Raumtemperatur gemessenen Spektren der photostationären Zustände unterscheiden sich: Beim $trans \rightarrow cis$ -Übergang ist die Absorptionsabnahme in der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande eindeutig nachweisbar und die entsprechende Zunahme in der wesentlich schwächer absorbierenden $S_1(n\pi^*)$ -Bande wird gerade noch aufgelöst. Das gekoppelte System isomerisiert demzufolge unter Bestrahlung analog zum freien Azoschalter, wobei hier die Amplituden der Differenzspektren bezogen auf die Absolutsignale kleiner sind. Da beide Systeme praktisch identische Chromophorspektren besitzen, kann das nur durch eine Verringerung der lichtinduzierten Konzentrationsänderungen von cis - und $trans$ -Isomer beim Azocollagen begründet sein.

NMR-Spektren zeigen bei niedrigen Temperaturen ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen den Isomerenverhältnissen der photostationären Zustände [373]. Belichtung bei 330 nm ($trans \rightarrow cis$) führt bei 4 °C zu 27 % cis - und 73 % $trans$ -Anteil. Wird dasselbe Experiment bei einer höheren Temperatur von 27 °C durchgeführt, dann werden 45 % cis und 55 % $trans$ -Anteil erreicht. Umgekehrt liegen nach Belichtung bei 420 nm ($cis \rightarrow trans$) ca. 92 % aller Azoschalter in $trans$ -Konfiguration vor. Ausgehend von diesen Gleichgewichtszuständen lässt sich feststellen, dass die $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierungsquantenausbeute temperaturabhängig ist und sich nach Erwärmung von 4 °C auf 27 °C etwa verdoppelt. Zum Vergleich: beim ungekoppelten Azoschalter isomerisieren etwa 75 % der $trans$ -Isomere in Folge der Bestrahlung und es wurde keine Temperaturabhängigkeit beobachtet.

Diese abgeschwächte, lichtinduzierte Modulation der Konzentrationsverhältnisse deutet auf eine Verringerung der Isomerisierungsquantenausbeute durch die Kopplung an die Collagensequenz hin. Denn die thermischen Rückreaktion haben Halbwertszeiten von etwa 9 h für das gekoppelte System und 25 h für den isolierten Schalter [373] und können diesen Unterschied nicht erklären. Solche Effekte wurden auch für verschiedene sterisch blockierte Azobenzolderivate beschrieben (vgl. Abschnitt 6.2.3, ab S 146) [295, 318]. Es ist also auch hier davon auszugehen, dass die sterische Beanspruchung eine effiziente lichtinduzierte Isomerisierung behindert.

Der Einfluss der Temperatur auf die photostationär erreichbare Ausbeute an cis -Isomeren wird durch die UV/vis-Spektren bestätigt. Das $trans \rightarrow cis$ -Differenzsignal bei 330 nm ist bei 70 °C fünfmal größer als bei 20 °C. Allerdings erkennt man auch im Spektrum des photostationären $trans$ -Zustands eine Abhängigkeit von der Temperatur. Die Absorption hat nach dem Aufheizen im gesamten Spektralbereich deutlich zugenommen. In der $S_2(\pi\pi^*)$ -Bande liegt sogar wesentlich über den Werten für das thermisch relaxierte $trans$ -Azocollagen der ersten Messung. Dieser Effekt ist mit einer veränderten Isomerisierungsquantenausbeute nicht zu erklären, da in der relaxierten Probe bereits 100 % aller Schalter in $trans$ -Konfiguration vorliegen.

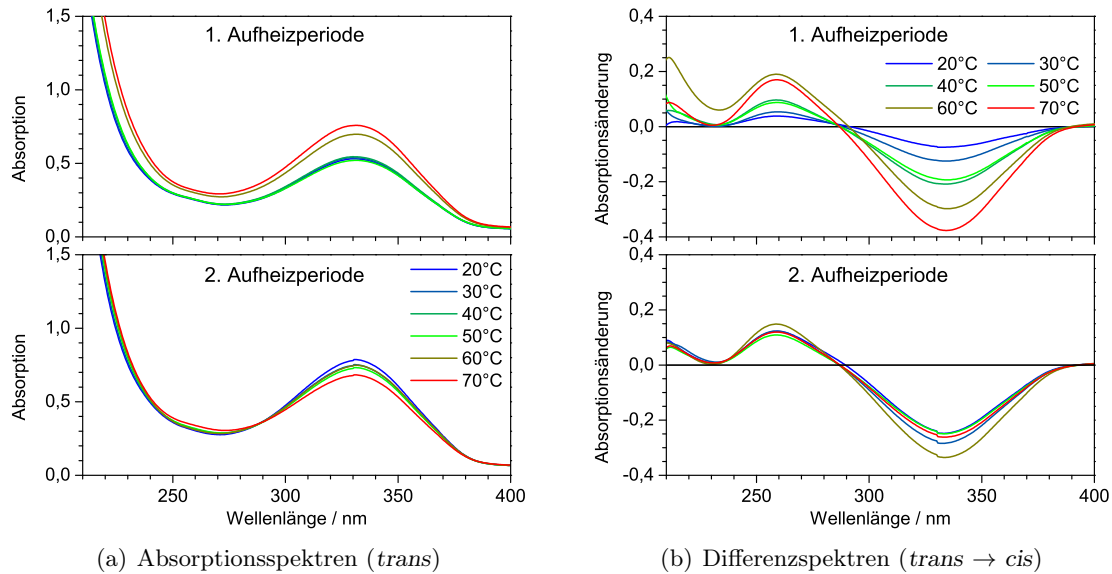


Abbildung 6.25: Untersuchung der thermisch induzierten irreversiblen Änderungen:
 (a) UV/vis-Absorptionsspektren der *trans*-Form in zwei Messreihen derselben Probe mit jeweils steigender Temperatur. Zwischen den Messreihen kühlte die Probe ab und wurde über zwei Tage thermisch relaxiert. Die zugehörigen *trans* → *cis*-Differenzspektren (b) zeigen bei erstmaliger Temperaturerhöhung wachsende Differenzsignale. In der zweiten Aufheizperiode tritt dies nicht mehr auf, hier sind die Differenzsignale im Vergleich zur ersten Erwärmung schon bei niedrigen Temperaturen erhöht.

Temperaturabhängigkeit Um den Einfluss der Erwärmung genauer zu untersuchen, wurden die photostationären Zustände bei verschiedenen Temperaturen untersucht. In Abbildung 6.25 sind die temperaturabhängigen Absorptionsspektren des *trans*-Zustands sowie die zugehörigen *trans* → *cis*-Differenzspektren dargestellt. Bei der erstmaligen Erwärmung der Probe bleiben die Absorptionsspektren bis zu einer Temperatur von 50 °C unverändert. Bei weiterer Aufheizung kommt es zu einer signifikant höheren Absorption des Chromophors sowie der Peptidgruppen bzw. zu einer Rotverschiebung der Peptidbande. In den korrespondierenden *trans* → *cis*-Differenzspektren lassen sich die mit steigender Temperatur anwachsenden Differenzsignale direkt verifizieren. Nach Abschluss der ersten Messreihe wurde die Probe abgekühlt und über zwei Tage thermisch relaxiert. Dann wurde die Messung wiederholt, wobei die aufgetretenen spektralen Veränderungen erhalten bleiben. Dieser Zeitraum ist deutlich länger als die notwendige Inkubationsdauer zur erstmaligen Bildung der Tripelhelix durch Selbstassoziation [370, 373, 382, 383]. Daher können die auftretenden spektralen Differenzen nicht durch eine thermisch induzierte Entfaltung in die Monomere mit anschließender, langsamer Rückfaltung in die Collagenstruktur erklärt werden. Insofern ist der zugrundeliegende Prozess als irreversibel anzusehen.

Beim erneuten Aufheizen der zuvor relaxierten Probe treten derartige Effekte nicht mehr auf: das Absorptionsspektrum entspricht schon bei niedrigen Temperaturen dem

bei 70 °C aus der ersten Messreihe – sowohl in der Absorption bei 330 nm als auch im Bereich der Peptidbande. Auch die *trans* → *cis*-Differenzspektren zeigen keine Temperaturabhängigkeit mehr: die Differenzsignale gleichen denen der ersten Messreihe bei 60 °C und 70 °C. Die Schwankungen in den Spektren der zweiten Messung werden vermutlich durch nicht exakt reproduzierbare Messbedingungen sowie die partielle Degeneration der Probe aufgrund der langen Messdauer verursacht. Offensichtlich führt die Erwärmung der Azocollagenlösung auf mehr als ca. 50 °C zu irreversiblen Strukturänderungen, die im Spektrum sowohl im Bereich der Chromophor- als auch der Peptidbanden nachweisbar sind. Das kann mit dem Zerfall der Collagen-Tripelhelix in die Monomere erklärt werden, da die für diese Entfaltung charakteristische Schmelztemperatur in diesem Bereich liegt (vgl. Abschnitt 6.6.3, S. 216 ff.).

Mit der Dissoziation der Tripelhelix nimmt die Absorption der Peptidgruppen unter 240 nm zu. Dieser hyperchrome Effekt wurde sowohl für die thermische Denaturierung natürlicher als auch synthetischer Collagene beschrieben [384–386]. Derselbe Effekt tritt auch bei der thermisch induzierten Spaltung von DNA in zwei Einzelstränge auf und wird dort als Nachweis der Denaturierung genutzt [387, 388]. Wegen der hohen eingesetzten Konzentration ist eine genaue Analyse der Peptidsignale leider nicht möglich und es wird nur eine Rotverschiebung der Flanke bei 220 nm nachgewiesen. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Monomere isoliert in der Lösung verbleiben oder ob in der Folge Nebenreaktionen wie z. B. Assoziation ablaufen. Insofern wären im kurzwelligen Bereich möglicherweise auch erhöhte Streulichtanteile zu berücksichtigen.

Auch für die an eine Collagen-Tripelhelix gekoppelten Azoschalter kann ein hyperchromer Effekt infolge der Dissoziation die beobachtete Absorptionzunahme erklären. Bei intakter Tripelhelix befinden sich die drei Azoschalter in unmittelbarer räumlicher Nähe und sind nahezu parallel zueinander ausgerichtet. Insofern sind Wechselwirkungen durchaus zu erwarten, und es erscheint plausibel, dass der der Absorptionsquerschnitt der Azoschalter einer intakten Tripelhelix kleiner ist als der von drei unabhängigen Monomeren. Bei Bildung der Tripelhelix gilt der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz offensichtlich nicht mehr. Das verhindert die optische Bestimmung der Konzentration der *trans*-Azoschalter für die intakten Azocollagene anhand ihrer Absorptionsbanden im UV/vis-Bereich. Folglich kann aus dem zugehörigen *trans* → *cis*-Differenzspektrum nicht quantitativ auf die Konzentrationsabnahme der *trans*-Isomere geschlossen werden. Die Bestimmung der Molenbrüche beider Isomere aus den UV/vis-Differenzspektren ist hier unzulässig.

Die Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Monomere erklärt ebenfalls die mit der Temperatur steigende Isomerisierungsquantenausbeute, die auch nach dem Abkühlen erhalten bleibt. Die Monomere sind flexibler und besitzen mehr Konformationsfreiraum als die zur Collagen-Superhelix assoziierten Einzelstränge. Entsprechend der geringeren sterischen Beanspruchung sollte die lichtinduzierte *trans* → *cis*-Isomerisierung effizienter ablaufen. Eine generell erhöhte Flexibilität bei höheren Temperaturen ist für die Monomere ebenso zu erwarten wie für gefaltete tripelhelikale Systeme.

Zusammenfassend lässt sich folgendes sagen:

- Beim Erwärmen einer Azocollagenlösung über 50 °C verändern sich die Absorptionsbanden des Azoschalters und der Peptidgruppen im UV/vis-Bereich.
- Dieser hyperchrome Effekt tritt nur beim ersten Erhitzen auf und die Veränderungen bleiben trotz thermischer Relaxation im Dunkeln über mehrere Tage erhalten. Bei der Wiederholung der Messreihe mit der zuvor aufgeheizten Probe wird keine Temperaturabhängigkeit mehr beobachtet.
- Die Absorptionszunahme nach Erhitzen über 50 °C geht mit der Erhöhung der Differenzamplituden der photostationären Gleichgewichte einher. Diese größeren Differenzsignale bleiben bei einer Wiederholung der Messung der zuvor aufgeheizten Probe ebenfalls im gesamten Temperaturbereich bestehen.
- Aus der Tatsache, dass die ursprünglichen Absolut- und Differenzspektren auch thermischer Relaxation im Dunkeln nicht reproduzierbar sind, folgt der Schluss, dass diese Denaturierung irreversibel ist.
- Alle Befunde lassen sich mit dem Zerfall der Collagentripelhelix in die Monomere ab einer Temperatur von etwa 50 °C konsistent erklären.

6.6.2 Charakterisierung im infraroten Spektralbereich

Im infraroten Spektralbereich unterscheiden sich die Absorptionsspektren des isolierten Schalters und des Azocollagens deutlich. Einerseits werden die bereits diskutierten IR-Banden des Azoschalters durch die zahlreichen Oszillatoren des Peptidrückgrats überlagert, andererseits führt das verwendete deuterierte Lösungsmittelgemisch (EG- d_6 :D₂O) zu einem H/D-Austausch der aziden Wasserstoffe der Aminogruppen. Das verursacht große Verschiebungen einiger Banden des Azoschalters selbst (z. B. Amid II → Amid II'). Zunächst ist daher der Einfluss des Lösungsmittels und des durch H/D-Austausch gebildeten HDO auf die IR-Absorptionsspektren zu klären.

Eigenschaften des Lösungsmittels

Abbildung 6.26(a) zeigt die Absorptionsspektren des Azocollagens in EG- d_6 :D₂O, des reinen Lösungsmittels sowie deren Differenz im Bereich von 1000 cm⁻¹ bis 4000 cm⁻¹. In den Spektralbereichen von 1000 cm⁻¹ bis 1300 cm⁻¹ sowie von 2100 cm⁻¹ bis 2800 cm⁻¹ finden sich sehr starke Lösungsmittelabsorptionen, hier kann keine quantitative Auswertung erfolgen. Die Signale der funktionellen Gruppen des Azocollagens treten zwischen 1300 cm⁻¹ und 1700 cm⁻¹ auf.

Bei 3400 cm⁻¹ ist eine starke, breite und unstrukturierte Absorptionsbande im Lösungsmittel erkennbar. Sie kann der schwach wasserstoffverbrückten O–H-Streckschwingung von HDO zugeordnet werden [189, 389, 390]. Dieses ist in dem deuterierten Lösungsmittelgemisch in geringen Mengen als Verunreinigung enthalten und wird auch durch den

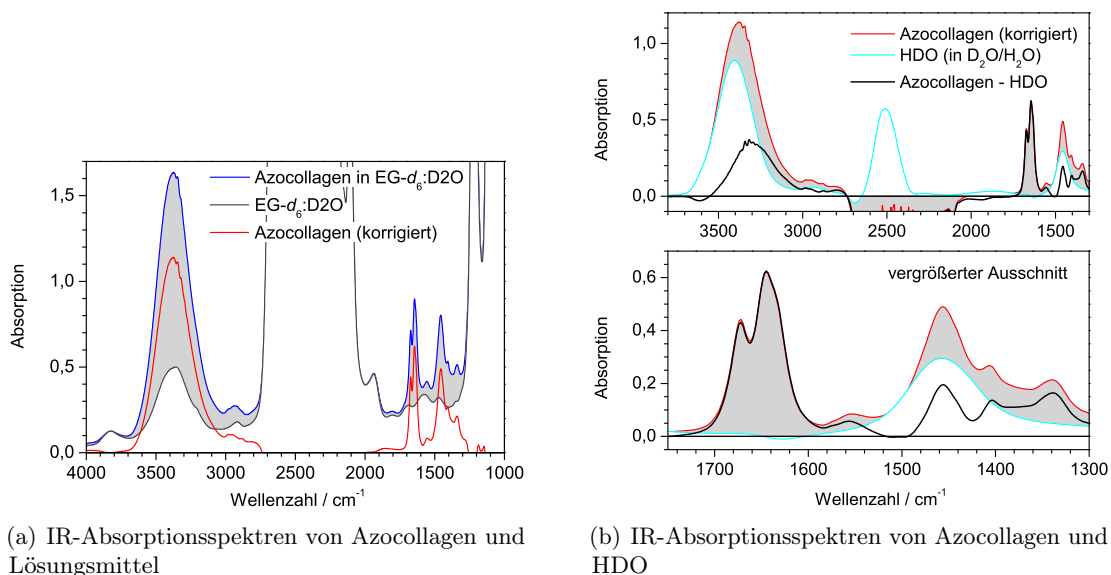


Abbildung 6.26: Im IR-Absorptionsspektrum des Azocollagens (a) bleiben nach Subtraktion des Lösungsmittelspektrums ungewöhnlich große Signale im Bereich der Amid A ($\approx 3500 \text{ cm}^{-1}$) und der Amid II'-Bande ($\approx 1450 \text{ cm}^{-1}$). Ursache ist der H/D-Austausch der Probe, der zur Bildung von HDO führt. Durch Subtraktion eines Spektrums von HDO in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ lässt sich der Einfluss abschätzen 6.26(b). Die HDO Daten wurden freundlicherweise von Carsten Krejtschi und Gabriela Schäfer zur Verfügung gestellt.

H/D-Austausch mit dem in der Luft vorhandenen Wasserdampf bei der Präparation angereichert. Entsprechend zeigt sich diese Bande auch in der Referenzmessung des reinen Lösungsmittels.

Bei der Probenlösung besitzt diese Bande jedoch eine dreimal stärkere Absorption als bei der Referenzlösung, was einer dreifach höheren HDO-Konzentration entspricht. Diese Zunahme kann mit dem H/D-Austausch von an die lyophilisierte Probe gebundenen Wassermolekülen sowie von lösungsmittel-exponierten Wasserstoffatomen des Modellpeptids selbst erklärt werden. Dies führt zur Bildung des zusätzlichen HDO nach dem Auflösen der Substanz. Die Referenzierung versagt hier zwangsläufig, eine Subtraktion der HDO-Signale ist wegen der unbekanntenen und veränderlichen Konzentration nicht ohne weiteres möglich.

Für Mischungen aus H_2O und D_2O wurde zwar demonstriert, dass man die Konzentration aller auftretenden Spezies bestimmen und so das Spektrum von reinem HDO in diesem Lösungsmittel berechnen kann [59]. Beim vorliegenden Lösungsmittelgemisch ist dieses Verfahren jedoch ungeeignet, da neben den Konzentrationen von H_2O , D_2O und HDO auch noch die des Ethylenglykols zu bestimmen ist. Bei den verwendeten Schichtdicken ist zudem der für H_2O entscheidende Spektralbereich unterhalb von 1300 cm^{-1} nicht zugänglich. Eine Korrektur des Einflusses von HDO im relevanten Spektralbereich von 1300 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} kann allein mit den vorliegenden Daten also nicht erfolgen.

Trotzdem kann auf Grundlage des bekannten Spektrums von HDO in Wasser der Einfluss auf das Probenspektrum grob abgeschätzt werden.

In Abbildung 6.26(b) ist das Absorptionsspektrum von HDO in Wasser zusammen mit dem des Azocollagens und ihrer Differenz im gesamten Bereich (oben) und im Bereich der Peptidbanden (unten) dargestellt. Das HDO Spektrums wurde so skaliert, dass nach der Subtraktion keine negativen Banden entstehen. Die breite und unstrukturierte Absorptionsbande bei 1460 cm^{-1} kann der HDO-Beugeschwingung (ν_2) zugeordnet werden [189, 389]. Offensichtlich ist ein wesentlicher Teil der Signale in diesem Bereich auf die Absorption von HDO zurückzuführen. Im Bereich der O–H-Streckschwingung ($\approx 3300\text{ cm}^{-1}$) erkennt man deutlich, dass die Banden von HDO in Wasser und in EG- d_6 :D₂O nicht übereinstimmen, was nicht mit den Amid A- oder Amid B-Moden des Peptids [47] zu erklären ist. Da beide Spektren bei derselben Temperatur von 22°C gemessen wurden, ist ein Temperatureffekt ebenfalls auszuschließen. Ursache sind vermutlich die in beiden Lösungsmittelgemischen unterschiedlich starken Wasserstoffbrückenbindungen: die Rotverschiebung in EG- d_6 :D₂O entspricht einer stärkeren Bindung. Offensichtlich lassen sich die Spektren wegen der unterschiedlichen Lösungsmittel nicht ohne weiteres voneinander abziehen. Die spektrale Charakteristik des HDO ist daher auch in der weiteren Auswertung zu beachten – insbesondere bei der Betrachtung der Temperaturabhängigkeit.

Infrarotbanden des Azocollagens

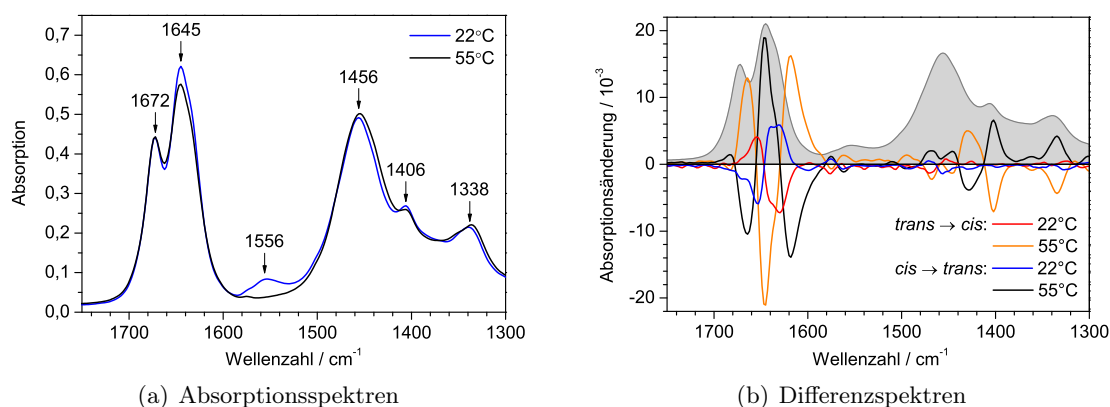


Abbildung 6.27: IR-Absorptionsspektren und Differenzspektren der photostationären Zustände des Azocollagens bei 22°C und 55°C : die Zuordnung der Banden erfolgt im Text (vgl. Tabelle 6.6). In den Differenzspektren (b) ist zum Vergleich das Absorptionsspektrum der trans -Form bei 22°C in grau hinterlegt.

Die Signatur der funktionellen Gruppen des Azocollagens ist schmalbandiger und strukturierter als die des HDO und kann so trotz der Überlagerung interpretiert werden. In Abbildung 6.27(a) sind die Absorptionsspektren des Azocollagens im Bereich von 1300 cm^{-1} bis 1750 cm^{-1} bei 22°C und 55°C gezeigt. Die Bandenzuordnung erfolgt anhand der typischen Absorptionsbereiche der vorhandenen funktionellen Gruppen (Tab. 6.6).

Bezeichnung	Bemerkung	Bereich/cm ⁻¹	Referenz
$\nu(\text{C=O})$	Amid I	1700 – 1610	[47]
$\delta_s(\text{N-H})+\nu(\text{C-N})$	Amid II	≈ 1550	[47, 391]
$\nu(\text{C-N})$	Amid II'	1490 – 1460	[48, 49]
$\nu(\text{C-N})$	Pro	1465 – 1400	[392–395]
$\delta(\text{H-O-D})$	Solvens	≈ 1460	[59, 189, 389], Abb. 6.26(b)
$\delta(\text{C-H}_2)$	allgemein	1475 – 1425	[49]
$\delta(\text{C-H}_2)$	Pro	1472 – 1447	[396]
$\gamma_w(\text{C-H}_2)$	allgemein	1382 – 1170	[397]
$\delta(\text{C-H})$	allgemein	1350 – 1315	[49]

Tabelle 6.6: Übersicht der Spektralbereiche der Normalmoden bzw. der Schwingungsmoden vorhandener funktioneller Gruppen wie in der Literatur angegeben. Weitere Informationen über die IR-Absorptionsbanden von Aminosäuren, Peptiden und deren Seitenketten finden sich in [48, 49, 377].

Mit Hilfe der feinstrukturverstärkten Spektren wird die Zuordnung in Abschnitt 6.6.2 ab Seite 214 noch einmal wesentlich verfeinert. Zunächst werden nur die bei Raumtemperatur erhaltenen Daten diskutiert, was den Vergleich mit dem isolierten Azoschalter erlaubt.

Der H/D-Austausch bei Peptiden und Proteinen sowie seine Auswirkungen auf das IR-Absorptionsspektrum wurden bereits in Abschnitt 2.3.2 (S. 9) allgemein beschrieben. Beim Azocollagen ist davon auszugehen, dass die lösungsmittel-exponierten Prolin-, Hydroxyprolin- und Azoschalter-Aminogruppen schon bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten deuteriert werden. Bei dem bei 22 °C aufgenommenen Absorptionsspektrum sollten diese Gruppen vollständig deuteriert sein und keine Amid II-Mode mehr aufweisen. Entsprechend besitzt das Azocollagen in EG-*d*₆:D₂O eine wesentlich kleinere Amid II-Bande als im aprotischen DMSO [373].

Im Gegensatz zu diesen schnell austauschenden Gruppen sind die in das Innere der Tripelhelix gerichteten Amino-Protonen der Glycinreste sowohl sterisch als auch durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Prolin-Carbonylen vor dem Austausch geschützt (vgl. Abb. 6.4, S. 160). Die bei 22 °C auftretende isolierte Bande bei 1550 cm⁻¹ kann folglich der Amid II-Mode der Glycinreste zugeordnet werden. Das zeigt, dass das selbst das lyophilisierte Azocollagen zumindest zu großen Teilen bereits in tripelhelikaler Struktur vorlag. Ansonsten wäre es noch vor der Bildung der Collagen-Superhelix zum Austausch dieser Protonen gekommen. Nach dem Aufschmelzen der Collagen-Superhelix bei hohen Temperaturen erfolgt auch hier der H/D-Austausch, dabei ist die Entfaltung der Tertiärstruktur der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Im IR-Absorptionsspektrum bei 55 °C ist das Signal bei 1550 cm⁻¹ nicht mehr vorhanden, was bedeutet, dass der Protonenaustausch auch an den Glycinen abgeschlossen ist. In diesen Absolutspektren lässt sich die Collagenentfaltung infolge der Erwärmung also eindeutig nachweisen. Das Gleichgewicht wird bei hohen Temperatur auf die Seite der Monomere verlagert und aufgrund der vergleichsweise langsamen Rückreaktion, kann von einer vollständigen Dissoziation ausgegangen werden.

Im Bereich zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} finden sich drei Amid I-Banden, deren niederfrequente nur als Schulter auftritt. Diese entsprechen den verschiedenen Peptidbindungen des Triplets (Gly, Pro, Hyp). Die Peptidgruppen der Azoschalter werden in diesen Spektren nicht aufgelöst.

Die bei 1450 cm^{-1} auftretenden Peptidbanden (Amid II' und $\nu(\text{C-N})$) werden durch die breite HDO-Absorption überlagert und können spektral nicht separiert werden. Ebenso lassen sich die CH- und CH₂-Biegeschwingungen im Bereich unterhalb von 1470 cm^{-1} nicht auflösen, insofern wird an dieser Stelle auf eine genaue Einordnung verzichtet.

Photostationäre *trans* → *cis*-Differenzspektren bei 22°C Die Unterschiede zwischen den Absorptionsspektren der photostationären *trans*- und *cis*-Isomere sind nur sehr gering und in den Absolutspektren nicht nachvollziehbar. Deshalb werden nur die Differenzspektren gezeigt (Abb. 6.27(b)).

Die Absorptionsdifferenz zwischen den photostationären Gleichgewichten macht im Maximum etwa 1% der Absolutsignale aus, was eine Größenordnung unter den rein thermisch induzierten Differenzsignalen beim Aufheizen auf über 50°C liegt. Auch im infraroten Spektralbereich sind die Differenzspektren des gekoppelten Systems also deutlich kleiner als die des isolierten Azoschalters. Das ist die Folge der verringerten Ausbeute der *cis*-Form durch die Belichtung nach der Kopplung des Azoschalters an die Collagentripelhelix. Dieser Effekt wurde in den UV/vis-Absorptionsspektren des Azocollagens ebenso gefunden und dort bereits ausführlich beschrieben.

Das größte *trans* → *cis*-Differenzsignal liegt im Bereich der Amid I-Bande. Es besteht aus mehreren Komponenten: einer positiven Differenzbande mit einem Maximum bei 1655 cm^{-1} und einer Schulter bei 1670 cm^{-1} sowie einer negativen Bande mit einem Minimum bei 1630 cm^{-1} und einer Schulter bei 1640 cm^{-1} . Der Vergleich mit dem Absorptionsspektrum zeigt, dass die auftretenden Differenzen nicht direkt mit den Absolutsignalen korrelieren. Offensichtlich besteht der Amid I-Bereich aus einer komplexen Überlagerung vieler Banden, die zum Differenzsignal beitragen, von denen jedoch nur die drei größten im Absorptionsspektrum deutlich getrennt sind. Diese Analyse wird durch die feinstrukturverstärkten Spektren bestätigt.

Eine naheliegende Annahme wäre, dass die Peptidgruppen des Azoschalters besonders sensitiv auf die Isomerisierung der Azobenzol-Untereinheit reagieren. Ihre Signatur sollte dann im photostationären Differenzspektrum nachzuweisen sein. Dies kann durch die vorliegenden Daten jedoch nicht bestätigt werden: Die Wellenzahl der Amid I-Mode der Azoschalter-Peptidgruppe kann aus dem PFID und dem Bleichsignal in den zeitaufgelösten IR-Differenzspektren bestimmt werden. Sie liegt bei 1645 cm^{-1} (Abb. 6.42, S. 235), was in etwa der negativen Schulter der *trans* → *cis*-Differenz entspricht. Allerdings zeigte sich bei der *trans* → *cis*-Isomerisierung des isolierten Schalters in DMSO-*d*₆ eine Rotverschiebung der Amid I-Bande, die sich hier nicht feststellen lässt. Betrachtet man die Differenzbanden des gekoppelten Systems in DMSO-*d*₆, dann zeigt sich eine komplexe Überlagerung der Schaltersignatur mit einer Vielzahl weiterer Differenzbanden, die den Collagen-Sequenzen zuzuordnen sind [373].

Wegen des H/D-Austausches ist das Signal der Amid II-Bande des Azoschalters in EG- d_6 :D₂O in den Amid II'-Bereich verschoben. Die genaue Position lässt sich wieder direkt aus den Bleichsignalen der transienten IR-Differenzspektren bestimmen: sie liegt bei 1455 cm⁻¹ (vgl. Abb 6.42, S. 235). Das Gleichgewichtsdifferenzspektrum besitzt hier jedoch kein Minimum, wie es bei den Messungen am isolierten und gekoppelten System in DMSO- d_6 bei 1550 cm⁻¹ beobachtet wurde (vgl. Abb. 6.11(b), S. 170 und [373]). Auch in diesem Bereich muss also von einer Überlagerung der negativen Differenzbande des Azoschalters mit positiven Beiträgen der Collagen-Peptide ausgegangen werden.

In DMSO- d_6 treten Differenzsignale bei 1500 cm⁻¹ (+) und 1575 cm⁻¹ (-) auf, die außerhalb der starken Banden der Collagenpeptide liegen [373]. Diese können den Schwingungsmoden der Phenylringe des Azobenzols zugeordnet werden (vgl. Tab. 6.3, S. 171). Da diese nicht durch den H/D-Austausch beeinflusst werden, sollten sie im *trans* → *cis*-Differenzspektrum des Azocollagens in EG- d_6 :D₂O ebenso auftreten. Während eine negative Bande bei 1575 cm⁻¹ eindeutig vorhanden ist, kann die positive bei 1600 cm⁻¹ nur im Vergleich mit dem *cis* → *trans*-Differenzspektrum identifiziert werden, weil sie durch eine wesentlich breitere, negative Amid I-Bande nahezu kompensiert wird. Die korrekte Zuordnung zum Azoschalter kann auch in diesem Fall anhand der Bleichsignale in den transienten IR-Differenzspektren verifiziert werden (vgl. Abb 6.42, S. 235).

Reversibilität der Photoreaktion bei 22 °C Das *cis* → *trans*-Differenzspektrum ist im Rahmen der Messgenauigkeit spiegelbildlich zu dem der *trans* → *cis*-Isomerisierung, was auf einen reversiblen Prozess schließen lässt. Insofern lassen sich zwar keine neuen Aussagen über das Infrarotspektrum ableiten, die beobachtete Reversibilität erlaubt jedoch Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Photoreaktionen.

So kann eine vollständige lichtinduzierte Entfaltung der Tripelhelix bei 22 °C als Ursache der Differenzspektren praktisch ausgeschlossen werden. Denn während die Entfaltungsreaktion direkt nach der UV-Belichtung abgeschlossen ist, findet die Rückreaktion – also die Bildung der Superhelix aus den Monomeren – wesentlich langsamer statt. Das gespiegelte Differenzspektrum wurde jedoch direkt nach der Bestrahlung aufgenommen ohne eine erneute Gleichgewichtseinstellung zwischen Tripelhelix und Monomeren abzuwarten.

Diese reversible Isomerisierung des gekoppelten Azoschalters wird auch im sichtbaren Spektralbereich beobachtet. Aus UV/vis-Spektren lässt sich jedoch nur auf die Konfiguration der Azoschalter schließen, während im struktursensitiven Infrarotspektrum deutliche Unterschiede zwischen gefaltetem Trimer und den Monomeren zu erwarten sind. Als Markerbande kann hier insbesondere der Bereich um 1550 cm⁻¹ angesehen werden, da nach dem Zerfall in die Monomere der irreversible H/D-Austausch an den Glycinen stattfinden sollte. Es kann aber kein entsprechendes Differenzsignal identifiziert werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die lichtinduzierte *trans* → *cis*-Isomerisierung bei Raumtemperatur keine nennenswerte Entfaltung der Tripelhelix bedingt.

Für diese Beobachtungen kommen zwei verschiedene Erklärungsansätze in Frage:

1. Die Bestrahlung mit UV-Licht führt zu einer *trans* → *cis*-Isomerisierung der gekoppelten Azoschalter. Bei niedrigeren Temperaturen verhindert die höhere

Stabilität der Collagen-Tripelhelix die vollständige Entfaltung. Die Isomerisierung der Azoschalter erzeugt nur eine lokale, reversible Störung der Struktur.

2. Die starre Struktur und hohe Stabilität der Tripelhelix verhindert die lichtinduzierte *trans* → *cis*-Isomerisierung der gekoppelten Azoschalter vollständig, analog zu sterisch beanspruchten Azobenzolderivaten [319]. Eine Konfigurationsänderung kann nur bei den Molekülen erfolgen, die als Monomer oder nicht korrekt gefaltete Spezies vorliegen.

Photostationäre Absorptions- und Differenzspektren bei 55 °C Die Differenzspektren der photostationären Zustände des Azocollagens bei 55 °C unterscheiden sich deutlich von denen bei Raumtemperatur (Abb. 6.27(b)). Beim direkten Vergleich erkennt man, dass die Amplituden bei 55 °C die bei 22 °C weit überragen. Das korreliert mit dem Befund aus Experimenten mit NMR- und UV/vis-Spektroskopie und ist eine Folge der größeren Isomerisierungsausbeute bei erhöhter Temperatur ([373], Abschnitt 6.6.1, ab S. 201).

Die maximalen Differenzamplituden im Amid I-Bereich haben sich nach dem Erwärmen verdreifacht und zeigen eine grundsätzlich veränderte Struktur. Diese besteht bei der *trans* → *cis*-Isomerisierung aus einer dominanten, negativen Bande (1645 cm^{-1}), die von zwei kleineren, positiven (1664 cm^{-1} , 1618 cm^{-1}) flankiert wird. Das entspricht einer Linienverbreiterung der größten Amid I-Bande, deren Maximum ebenfalls bei 1645 cm^{-1} liegt. Ein möglicher Einfluss der anderen Amid I-Moden kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da deren Position nahezu mit den isobestischen Punkten des lichtinduzierten Differenzspektrums zusammenfallen. Zusätzlich tritt ein kleines negatives Signal bei 1683 cm^{-1} auf. Von den bei 22 °C vorliegenden Differenzsignalen lässt sich nur noch eine Schulter bei 1630 cm^{-1} identifizieren.

Neben der veränderten Bandenstruktur im Amid I-Bereich sind nach der *trans* → *cis*-Isomerisierung bei 55 °C einige zusätzliche Differenzsignale zu erkennen. Am auffälligsten sind eine positive (1429 cm^{-1}) und zwei negative Banden (1402 cm^{-1} , 1334 cm^{-1}). Im Bereich um 1410 cm^{-1} sind die Signale unterschiedlicher Schwingungsmoden überlagert, wie aus der Form der Differenzbanden, dem Vergleich mit dem Differenzspektrum in DMSO- d_6 [373] und der Analyse der Feinstruktur (Abb. 6.29, S. S. 214) deutlich wird. Außerdem treten zwei kleine negative Banden bei 1469 cm^{-1} und 1446 cm^{-1} auf. Auch hier handelt es sich möglicherweise um eine breite negative Bande, die von einem positiven Differenzsignal der Phenylschwingung des Azoschalters teilweise kompensiert wird (vgl. Abb 6.42, S. 235).

Reversibilität der Photoreaktion bei 55 °C Das Differenzspektrum der *cis* → *trans*-Isomerisierung des Azocollagens ist wieder ein Spiegelbild des *trans* → *cis*-Spektrums. Auch bei erhöhter Temperatur ist die durch Belichtung und Isomerisierung der Azoschalter ausgelöste Reaktion vollkommen reversibel. Die größeren Differenzsignale entsprechen der effizienter ablaufenden photoinduzierten Isomerisierung der Azoschalter. Die veränderte Struktur im Amid I-Bereich sowie zusätzliche Differenzsignale im Vergleich

zur Messung bei 22°C deuten auf grundsätzlich verschiedene Prozesse bei beiden Temperaturen hin. Um diese zu erklären, ist eine genaue Analyse der Temperatureinflüsse auf die Infrarotspektren notwendig, die ab Seite 216 präsentiert wird. Hier sei nur erwähnt, dass das lichtinduzierte *trans* → *cis*-Differenzspektrum eine verblüffende Ähnlichkeit mit rein thermisch induzierten Differenzen – ohne Isomerisierung des Azoschalters – aufweist (vgl. Abb. 6.33(b) unten). Eine naheliegende Annahme ist, dass die weitere Erwärmung und die *trans* → *cis*-Isomerisierung einen vergleichbaren Einfluss auf diejenigen Peptidgruppen ausüben, die diese Differenzsignale erzeugen.

Im Bereich zwischen 1500 cm⁻¹ und 1300 cm⁻¹ ist das hier präsentierte *trans* → *cis*-Differenzspektrum bei 55°C mit dem in DMSO-*d*₆ aufgenommenen praktisch identisch [373]. Somit können alle durch den H/D-Austausch beeinflussten Schwingungsmoden als Ursache der großen Differenzsignale ausgeschlossen werden.

Die Differenzen werden im Wesentlichen durch die Konfiguration und Konformation der Peptid-Einzelstränge hervorgerufen. So sind z. B. die $\nu(\text{C-N})$ -Mode der Proline und die $\gamma_w(\text{C-H}_2)$ -Mode Indikatoren für die Konformation des Peptidrückgrats [49, 392, 393, 395]. Für die $\delta(\text{C-N}_2)$ -Mode wurde mit Ramanspektroskopie eine Verschiebung von 1465 cm⁻¹ bei *trans*-Polyprolin zu 1435 cm⁻¹ bei *cis*-Polyprolin festgestellt [393]. Dies entspricht sowohl den in EG-*d*₆:D₂O gefundenen Differenzsignalen als auch denen in DMSO-*d*₆ [373] und deutet damit auf die Isomerisierung von Prolinpeptidbindungen hin.

Geht man davon aus, dass diese Konfigurationsänderung wegen der Stabilität der tripelhelikalen Struktur nur in den Monomeren erfolgen kann, dann lassen sich weitere Aussagen ableiten. Generell lassen sich die Differenzbanden zwischen 1380 cm⁻¹ und 1500 cm⁻¹ als $\nu(\text{C-N})$ - sowie Deformationsschwingungen der C-H₂-Gruppen des Peptidrückgrats der Collagen-Einzelstränge einordnen (vgl. Tab. 6.6). Die kleine Bande bei 1406 cm⁻¹ im Absorptionsspektrum tritt ebenfalls in DMSO-*d*₆ auf und zeigt ein deutliches *trans* → *cis*-Differenzsignal an dieser Position [373]. Diese Signale lassen sich tendenziell einer *trans* → *cis*-Isomerisierung der Gly-Pro- oder Pro-Hyp-Peptidbindungen zuordnen, welche sind invariant gegen den H/D-Austausch und zugleich struktursensitiv sind. Außerdem werden vergleichbare Banden stets in Verbindung mit Prolin-Peptidbindungen beobachtet, diese wurden in der Literatur jedoch keiner spezifischen Schwingungsmode zugeordnet [394, 395, 398–400]. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Banden um komplexe Gruppenschwingungsmoden des Pyrrolidinringes der Proline, bei denen die C-N- und C-H₂-Moden koppeln und eine entsprechende Zuordnung nicht möglich ist.

Das Differenzsignal bei 1334 cm⁻¹ kann nur von den $\gamma_w(\text{C-H}_2)$ - oder den $\delta(\text{C-H})$ -Moden des Peptidrückgrats verursacht werden: Die Schwingungsfrequenzen der C-H₂-Gruppen der Prolin- und Hydroxyprolin-Seitenketten sollten nur wenig durch die *trans* → *cis*-Isomerisierung des Azoschalters beeinflusst werden. Nimmt man eine *trans* → *cis*-Isomerisierung der Prolin-Peptidbindungen als Verursacher dieser Differenzbande an, dann lässt sich das Glycin ebenfalls ausschließen, da diese Peptidbindung auch bei hohen Temperaturen nur in der *trans*-Konfiguration existiert. Daher wird dieses Signal tendenziell den $\delta(\text{C-H})$ -Schwingungen der Proline- und Hydroxyproline zugeordnet.

Feinstruktur des IR-Absorptionsspektrums

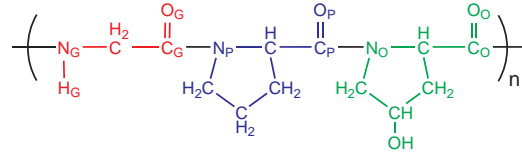


Abbildung 6.28: Azocollagen: Struktur der charakteristischen Sequenz der Aminosäuren Glycin (rot), Prolin (blau) und Hydroxyprolin (grün). Die Indizes der Carbonyl- und Aminogruppen orientieren sich am üblichen Einbuchstabencode für die Aminosäuren [363]: G (Gly), P (Pro), O (Hyp)

Es wurde bereits dargestellt, dass das Infrarotabsorptionsspektrum des Azocollagens aus vielen, nur teilweise separierten Banden besteht und zudem durch breitbandige HDO-Beiträge überlagert ist. Im Amid I-Bereich des *trans* → *cis*-Differenzspektrums zeigt zudem eine komplexe, temperaturabhängige Struktur. Darauf wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen. Es stellt sich die Frage, ob im Amid I-Bereich charakteristische Merkmale für den Zerfall der Tripelhelix auftreten, die hier nicht aufgelöst wurden. Um dies zu klären muss zunächst die Auflösung des Spektrums verbessert werden.

Ein Standardverfahren zur Auflösung überlappender, breiter Banden in Infrarotspektren ist die sogenannte Feinstrukturverstärkung. Das Ergebnis ist vergleichbar mit der Fourier-Selbstdekonvolution, jedoch kann die Berechnung sehr einfach in den erhaltenen Spektren selbst durchgeführt werden [401]. Im Gegensatz zur ebenfalls gebräuchlichen Berechnung der 2. Ableitung bleibt die ursprüngliche Form des Spektrums dabei erhalten.

Um das feinstrukturverstärkte Spektrum $A^{\text{fsv}}(\tilde{\nu})$ zu berechnen wird von dem Originalspektrum $A(\tilde{\nu})$ ein geglättetes Spektrum $\langle A(\tilde{\nu}) \rangle$ subtrahiert, welches mit einem Faktor $g < 1$ gewichtet ist. Zum Vergleich mit dem Originalspektrum wird die Differenz hier noch entsprechend skaliert:

$$A^{\text{fsv}}(\tilde{\nu}) = \frac{A(\tilde{\nu}) - g\langle A(\tilde{\nu}) \rangle}{1 - g} \quad (6.4)$$

Bei der Glättung bleiben breite Banden unverändert erhalten, davon abweichende schmalbandige Signale und Schultern werden jedoch unterdrückt. Gerade diese Feinstruktur wird nach der Subtraktion vom Originalspektrum also besonders betont und der Gewichtungsfaktor verhindert das Auftreten negativer Artefakte.

Die Originalspektren haben einen Datenpunktabstand von etwa 2 cm^{-1} , die Glättung erfolgt mit einem Savitzky-Golay-Algorithmus durch lokale Anpassung eines Polynoms zweiten Grades über neun Datenpunkte, der verwendete Gewichtungsfaktor ist $g = 0,99$.

Die Prozedur wurde für vier verschiedene Spektren unterschiedlicher Temperaturen durchgeführt. Es standen Spektren einer Aufheizphase ($9^\circ\text{C} \uparrow$) von 9°C bis 87°C zur Verfügung, sowie ein Spektrum bei 9°C welches nach dem anschließenden Abkühlen aufgenommen wurde ($9^\circ\text{C} \downarrow$). Für alle Spektren wurde zunächst eine Lösungsmittelkorrektur durchgeführt. Die zusätzliche Absorption des durch H/D-Austausch entstandenen HDO bleibt davon allerdings unberührt. Das Ergebnis wird in Abbildung 6.29 dargestellt,

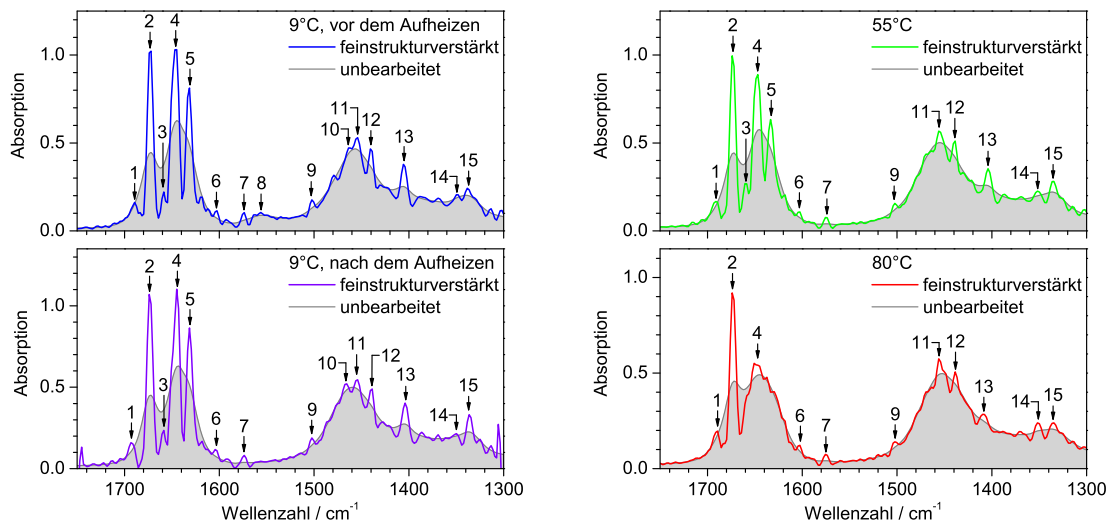


Abbildung 6.29: Ergebnis der Feinstrukturverstärkung der Absorptionsspektren bei verschiedenen Temperaturen: Das jeweils unbearbeitete Spektrum ist in grau hinterlegt. Die Zuordnung erfolgt im Text bzw. in Tabelle 6.7, eine vorherige Korrektur für die Banden von HDO erfolgte nicht.

wobei die Originalspektren zum Vergleich jeweils in grau hinterlegt wurden. Es ist gut zu erkennen, wie die in den Spektren enthaltenen überlagerten Banden durch dieses Verfahren getrennt und aufgelöst werden. Bei den gewählten Parametern kommt es zu einer extremen Reduktion der Linienbreite, daher kann das Auftreten von Artefakten nicht ausgeschlossen werden. Wegen der unbekanntenen Bandenform und -breite des Originals ist ein Vergleich mit bereits veröffentlichten, optimierten Parametern [401] nicht möglich. Auf die Interpretation der Amplituden wird daher verzichtet. Die ermittelten Maxima der Feinstruktur sind in Tabelle 6.7 zusammengefasst.

Aus den transienten IR-Differenzspektren können anhand der PFID-Signatur die Positionen der Banden des angekoppelten Azoschalters bestimmt werden (vgl. S. 228 ff.). Der Vergleich mit den feinstrukturverstärkten Spektren zeigt, dass diese nun aufgelöst werden. Aus der guten Übereinstimmung kann auch geschlossen werden, dass es sich bei den resultierenden kleinen Strukturen allgemein nicht um Artefakte handelt.

Weitere, jetzt getrennte, Feinstrukturelemente lassen sich auf der Grundlage der bereits diskutierten Absorptions- bzw. Differenzsignale zuordnen. Als Beispiel sei hier nur die Amid II-Bande der Glycine genannt, die nur im ersten Spektrum ($9^{\circ}\text{C}\uparrow$) aufgelöst wird.

Als Indikatoren für die Entfaltung der Collagen-Superhelix kommen in erster Linie die Banden der struktursensitiven Amid I-Moden der Peptidbindungen in Frage. Deshalb wird die Zuordnung für diesen Bereich ausführlich diskutiert. Eine vergleichbare Amid I-Struktur aus drei Banden wurde sowohl für natürliche Collagene [398, 402] als auch für synthetische Collagenpeptide [400, 403, 404] nachgewiesen. Der Grund für die Aufspaltung liegt in den nicht-äquivalenten Carbonylgruppen des Triplets (Gly–Xaa–Yaa), die sich in ihren chemischen Umgebungen, Konformationen und Kopplungen unterscheiden.

Nr.	Position/cm ⁻¹				Charakter	Zuordnung
	9°C↑	9°C↓	55°C	80°C		
1	1689	1693	1691	1689	Amid I	(Acetyl, N-term.)
2	1673	1674	1674	1674	Amid I	Hyp (C _O =O _O)
3	1658	1658	1659	–	Amid I	(Gly, C-term.)
4	1646	1645	1647	(1647)	Amid I	Gly (C _G =O _G)
5	1631	1631	1633	–	Amid I	Pro (C _P =O _P)
6	1603	1604	1603	1603	} $\nu(\text{C-C})$ $\delta(\text{C-H})$	Azoschalter, aromatische Phenylmoden
7	1574	1574	1574	1576		
9	1502	1502	1502	1502		
8	1556	–	–	–	Amid II	Gly
10	1464	1466	–	–	($\gamma_w(\text{C-N}_2)$)	(Pro, Hyp)
11	1454	1455	1456	1456	Amid II'	Azoschalter
12	1440	1439	1439	1439		Pro, Hyp
13	1406	1404	1404	1409		Pro, Hyp
14	1349	1350	1352	1352	$\gamma_w(\text{C-H}_2)$	Azoschalter
15	1338	1336	1335	1335	$\delta(\text{C-H})$	Pro, Hyp

Tabelle 6.7: Zuordnung der Feinstruktur der IR-Absorptionsspektren bei verschiedenen Temperaturen. Die Nummerierung entspricht Abb. 6.29, dabei ist 9°C↑ das IR-Absorptionsspektrum vor dem Aufheizen und 9°C↓ das nach Aufheizen und Abkühlen. Unsichere Bandenzuordnungen sind eingeklammert. Eine Korrektur für die Signale von HDO wurde nicht vorgenommen.

Für die hier vorliegende Grundsequenz (Abb. 6.28) sind spezifische Zuordnungen zu den einzelnen Gruppen bereits publiziert. Hier wurden die Untersuchungen von Bryan *et al.* an einem sehr ähnlichen Peptid: (Pro-Hyp-Gly)₄-Pro-Hyp-Ala-(Pro-Hyp-Gly)₅ als Referenz herangezogen [403]. Das publizierte Spektrum stimmt mit dem hier gemessenen hervorragend überein: Es zeigt ein Maximum bei 1644 cm⁻¹, eine etwas kleinere Bande bei 1671 cm⁻¹ sowie eine Schulter bei 1630 cm⁻¹. Die Analyse der Amid I-Bande beruht auf der direkten Berechnung der Peptidmoden und ihrer Kopplungen unter Berücksichtigung der genauen dreidimensionalen Struktur, die zuvor mittels einer Molekulardynamiksimulation verfeinert wurde. Die größte Bande (1644 cm⁻¹) besteht aus der Absorption der Glycin-Carbonyle (C_G-O_G) und geringeren Anteilen der Prolin-Carbonyle. Bei der niederfrequenten Schulter (1630 cm⁻¹) ist es gerade umgekehrt, hier dominiert die Prolin-Carbonyl-Mode (C_P-O_P) und die Glycine liefern einen geringeren Beitrag. Die Bande bei 1670 cm⁻¹ kann den Carbonylen der Hydroxyproline (C_O-O_O) zugeordnet werden. Die beiden Mercaptoproline, über die der Azoschalter an die Peptidsequenzen gekoppelt ist, werden dabei nicht gesondert berücksichtigt. Diese nehmen in der Sequenz jeweils die Position eines Prolins und eines Hydroxyprolins ein, besitzen also auch eine vergleichbare Umgebung und Konformation, insofern ist die Auflösung ihrer Signatur nicht zu erwarten.

Neben den drei diskutierten Hauptbanden erkennt man noch zwei kleinere Signale

bei 1689 cm^{-1} und 1658 cm^{-1} . Diese sind entweder die Folge von Aufspaltungen der Amidbande aufgrund der vorliegenden Kopplungen oder sie stammen von den übrigen Amid- bzw. Carbonylschwingungen. Insbesondere die Peptidgruppen des Azoschalters, der beiden C-terminalen Glycine oder auch der N-terminalen primären Amide sollten eine andere Schwingungsfrequenz aufweisen.

Die Komponente bei 1658 cm^{-1} liegt sehr nahe an der Hauptbande und kann deshalb tendenziell den beiden Glycin-Resten am amidierten C-Terminus zugeordnet werden. Diese sollten sich aufgrund der unterschiedlichen Umgebung geringfügig von den übrigen Glycinen unterscheiden. Eine Zuordnung zur Amid I-Mode der Azoschalter ist auszuschließen, da diese direkt aus den transienten IR-Differenzspektren zu 1645 cm^{-1} bestimmt werden kann (Abb. 6.42, S. 235) und ihre Wellenzahl mit der Hauptbande zusammenfällt. Die Komponente bei 1689 cm^{-1} besitzt eine ungewöhnlich hohe Schwingungsfrequenz für eine Amid I-Mode, die aber wiederum typisch für ein primäres Amid ist [376]. Daher wird sie tendenziell der Amidschwingung der terminalen Acetylgruppen zugeordnet.

Mit Hilfe der Feinstrukturverstärkung ist es zwar möglich die Auflösung der Spektren deutlich zu verbessern und viele der zuvor überlagerten Banden zuzuordnen. Allerdings zeigen die Spektren vor dem Aufheizen ($9^\circ\text{C}\uparrow$) und unmittelbar nach dem Abkühlen ($9^\circ\text{C}\downarrow$) keine signifikante Verschiebung der ermittelten Feinstrukturkomponenten. Das zwischenzeitliche Aufschmelzen der Tertiärstruktur ist jedoch anhand der Bande bei 1556 cm^{-1} zweifelsfrei nachzuweisen. Damit lässt sich feststellen, dass auch nach der Verbesserung der Auflösung keine weitere Markerbande für den Übergang von tripelhelikaler Struktur in die Monomere identifiziert werden kann.

6.6.3 Temperaturabhängigkeit der IR-Absorptionsspektren

In den vorangegangenen Abschnitten wurde bereits deutlich, dass sich infolge einer Erwärmung nicht nur die lichtinduzierten Differenzsignale, sondern auch die Absorptionsspektren des Azocollagens im UV/vis und IR massiv ändern. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass bei einer Temperatur von mehr als ca. 50°C das Dissoziationsgleichgewicht auf der Seite der Monomere liegt, die tripelhelikale Collagenstruktur also aufgeschmolzen wird. Im UV/vis-Bereich ist erkennbar werden, dass dieser Prozess irreversibel ist. Einerseits stellt sich also die Frage nach den Reaktionsprodukten bzw. warum die Tripelhelix nach dem Abkühlen nicht wieder gebildet wurde. Andererseits kann die genaue Untersuchung des Schmelzverhaltens Aufschluss über spektrale Charakteristika der vorliegenden Tertiärstrukturen geben oder der Festlegung des Schmelzpunktes dienen. Bei der Betrachtung der thermisch induzierten Differenzen des Azocollagenspektrums ist der Einfluss der HDO-Banden zu beachten, da diese ebenfalls eine starke Temperaturabhängigkeit aufweisen und die HDO-Konzentration während der Messserie zudem nicht konstant ist.

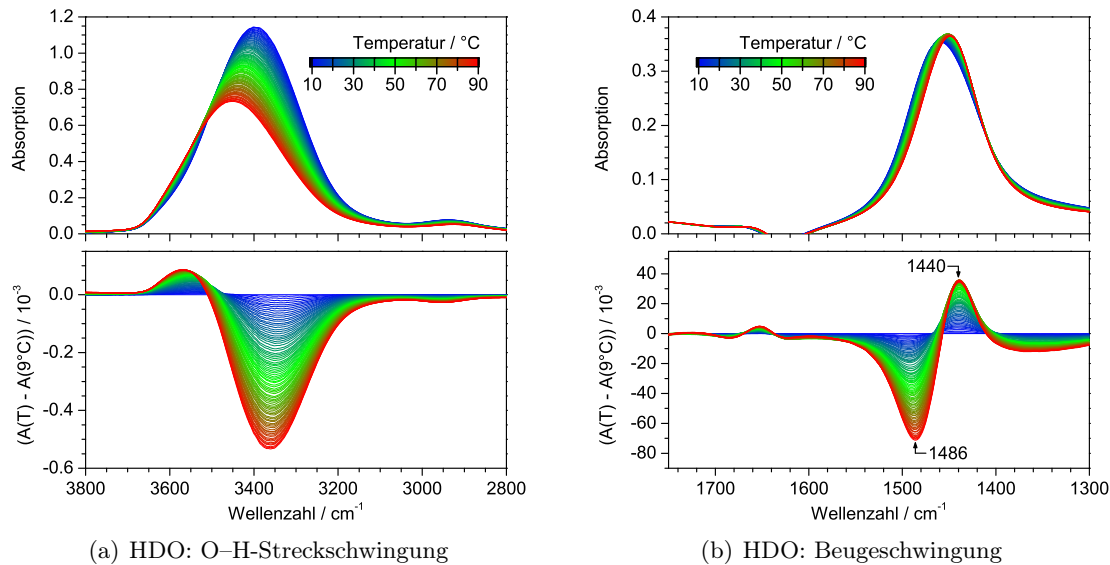


Abbildung 6.30: IR-Absorptions- und -Differenzspektren von HDO in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ bei verschiedenen Temperaturen [59]. Die Spektren wurden für die Beiträge von reinem H_2O und D_2O bereinigt und sind gemäß der maximalen Absorption bei 3400 cm^{-1} in der Azocollagenmessung (Abb. 6.31(a)) skaliert. Die Daten wurden freundlicherweise von Carsten Krejtschi zur Verfügung gestellt.

Temperaturabhängigkeit der HDO-Banden

In Abbildung 6.30 sind die Infrarotspektren von HDO in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ im Bereich der O–H-Streck- und Beugeschwingung bei verschiedenen Temperaturen dargestellt [59]. Die dominante O–H-Streckschwingungsbande bei 3400 cm^{-1} zeigt mit steigender Temperatur eine starke, kontinuierliche Absorptionsabnahme und Blauverschiebung. Im Bereich der HDO-Beugeschwingung bei 1460 cm^{-1} kommt es dagegen nur zu einer leichten kontinuierlichen Rotverschiebung und minimalen Absorptionszunahme des Maximums.

Bei der Azocollagenprobe ist das Signal des HDO anhand der O–H-Streckschwingungsbande bei 3400 cm^{-1} ebenfalls eindeutig zu identifizieren (Abb. 6.31(a)). Bei niedrigen Temperaturen überlagern kleine schmalbandige Signale zwischen 3250 cm^{-1} und 3450 cm^{-1} die unstrukturierte HDO-Bande. Es handelt sich vermutlich um die Amid A- und Amid B-Moden der Peptidgruppen. Bei höheren Temperaturen werden diese Signale nicht mehr aufgelöst. Im Gegensatz zu HDO in reinem Wasser wird hier bei Erwärmung bis etwa 25°C zunächst eine Absorptionszunahme anstelle der zu erwartenden Abnahme gefunden (Abb. 6.31(b) oben). Dies ist eine Folge der Konzentrationserhöhung von HDO durch den H/D-Austausch lösungsmittel-exponierter Gruppen und gebundener Wassermoleküle. Oberhalb von 25°C ist wieder derselbe Signalverlauf wie in Wasser zu beobachten: eine kontinuierliche Absorptionsabnahme und Blauverschiebung (Abb. 6.31(b) unten). Ein vergleichbarer H/D-Austauscheffekt tritt oberhalb von 25°C also nicht mehr auf, die zugehörigen Prozesse sind praktisch vollständig abgeschlossen.

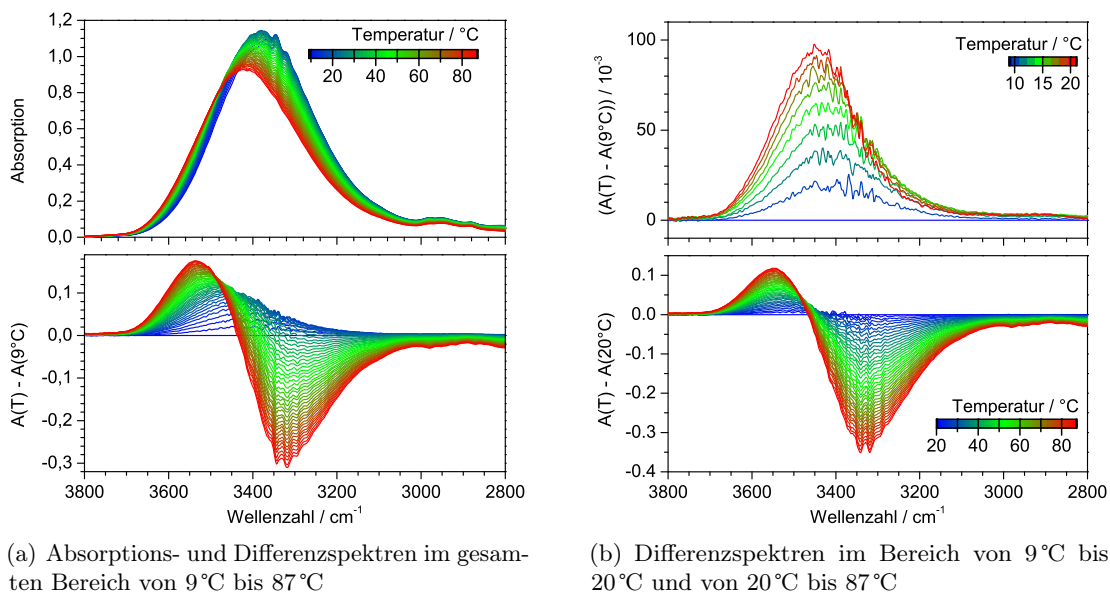


Abbildung 6.31: Temperaturabhängigkeit der IR-Absorptionsspektren der Azocollagenmessung im Bereich von 3400 cm^{-1} . Als Referenz der Differenzspektren diente jeweils das IR-Absorptionsspektrum der niedrigsten Temperatur der Kurvenschar.

Die Steigerung der Absorption und somit der HDO-Konzentration beträgt bis 25°C etwa 8%. Diese veränderliche Konzentration wird sich ebenso auf die Absorption im Bereich der HDO-Beugeschwingung bei 1460 cm^{-1} auswirken. Die Auswertung ist in diesem Bereich schwieriger, da zahlreiche Banden des Azocollagens mit teilweise starken Temperaturabhängigkeiten das HDO-Signal überlagern.

Abbildung 6.32(a) zeigt die Schmelzkurven der Azocollagenprobe bei drei verschiedenen Wellenzahlen. Hierzu wird das Signal – in diesem Fall die Absorptionsänderung – in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Der Verlauf bei 3385 cm^{-1} , dem Maximum der HDO-Bande bei niedrigen Temperaturen, zeigt das bereits diskutierte Verhalten: bis etwa 25°C nimmt die Absorption aufgrund des H/D-Austausches zu, danach kehrt sich der Kurvenverlauf um und zeigt schliesslich eine lineare Absorptionsabnahme.

Die Schmelzkurven auf den Wellenzahlen der HDO-Beugeschwingung (1456 cm^{-1}) und der Amid II'-Bande des Glycins (1471 cm^{-1}) zeigen zunächst ebenfalls eine starke Absorptionszunahme bis etwa 25°C . Zwischen 25°C und dem Maximum bei etwa 55°C besitzen beide Kurven eine geringere, aber immer noch positive Steigung. Alle Schmelzkurven zeigen also zunächst die Erhöhung der HDO-Konzentration, die bei etwa 25°C abgeschlossen ist. Oberhalb von etwa 55°C kehrt sich der Verlauf der Kurven bei 1456 cm^{-1} und 1471 cm^{-1} um und die Absorption sinkt mit steigender Temperatur. Das deutet auf einen weiteren thermodynamischen Übergang hin.

Noch deutlicher werden diese Übergangstemperaturen bei Auftragung der ersten Ableitung des Signals $dA(\tilde{\nu})/dT$ gegen die Temperatur, was die Änderungen des Verlaufes

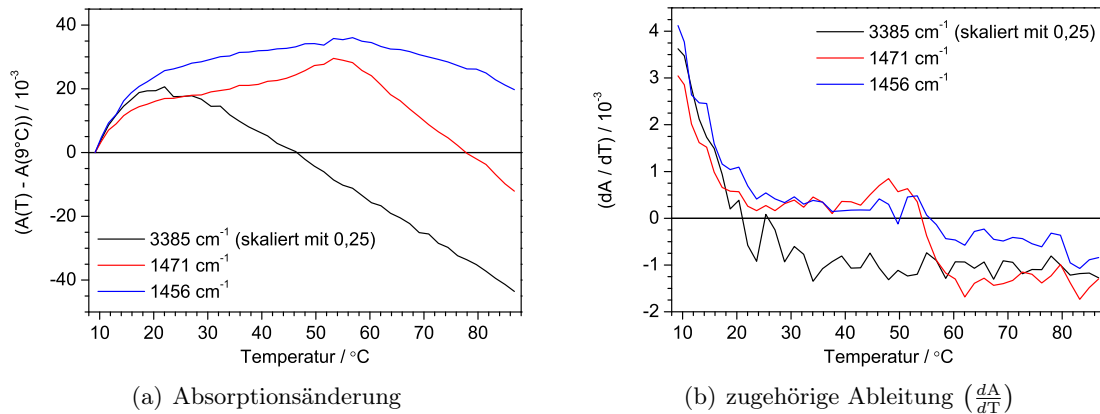
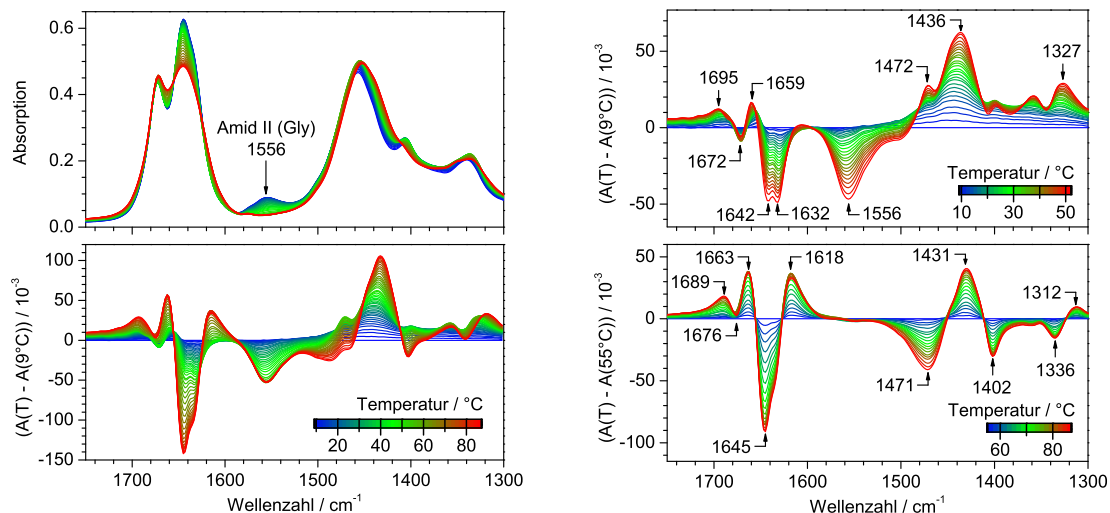


Abbildung 6.32: IR-Schmelzkurven im Bereich der HDO-Absorptionsbanden – Absorptionsänderungen bei verschiedenen charakteristischen Wellenzahlen bezogen auf das Referenzspektrum bei 9°C (a) sowie die erste Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur (b).

der Schmelzkurven heraushebt (Abb. 6.32(b)). Unterhalb von 25°C zeigen alle drei Kurven die Entstehung von HDO. Die Rate nimmt dabei stetig ab, da mit steigender Temperatur und Messdauer die Anzahl der noch nicht getauschten Protonen abnimmt. Ab 25°C sind diese Prozesse abgeschlossen, die konstanten Ableitungen repräsentieren den linearen Verlauf der Schmelzkurven analog zu denen von HDO in reinem Wasser. Bei 55°C ergibt sich ein weiterer Sprung in der Kurve, der eine abrupte Änderung der thermisch induzierten Vorgänge anzeigt. Wie man gut erkennen kann, betrifft dieser Prozess allein den Bereich der Peptidbanden: die Steigung der Kurve bei 3385 cm^{-1} bleibt konstant. Der H/D-Austausch der Glycin-Protonen hat offensichtlich keinen messbaren Einfluss mehr auf die Absorption bzw. Konzentration von HDO.

Zusammenfassend lässt sich in Bezug auf die HDO-Absorption feststellen:

1. In den Spektralbereichen um 3400 cm^{-1} und 1460 cm^{-1} hat das HDO einen großen Einfluss auf die gemessenen Infrarotspektren der Probe.
2. Unterhalb von etwa 25°C nimmt die Konzentration und somit die Absorption zu, wobei die Rate mit steigender Temperatur sinkt.
3. Oberhalb von 25°C ergeben sich kontinuierliche Absorptionsänderungen aufgrund der bekannten Temperaturabhängigkeit der HDO-Banden.
4. Die Korrektur durch Abzug der Lösungsmittelspektren bleibt wirkungslos, da ein H/D-Austausch nur in der Probenzelle stattfindet und nur dort zu veränderlichen Konzentrationen von HDO führt.



(a) Absorptions- und Differenzspektren für den Bereich von 9°C bis 87°C

(b) Differenzspektren für die Bereiche von 9°C bis 55°C und 55°C bis 87°C

Abbildung 6.33: Temperaturabhängigkeit der IR-Absorptionsspektren des Azocollagens. Die Interpretation wird durch verschiedene, überlagerte Prozesse erschwert (a). Eine getrennte Betrachtung der Temperaturbereiche unterhalb und oberhalb von 55°C zeigt, dass bei höheren Temperaturen nur noch ein Prozess auftritt (b). Als Referenz der Differenzspektren diente jeweils das IR-Absorptionsspektrum der niedrigsten Temperatur der Kurvenschar.

Temperaturabhängigkeit der Azocollagen-Banden

Die Absorptions- und Differenzspektren der Azocollagenprobe sind in Abbildung 6.33(a) für den gesamten Temperaturbereich von 9°C bis 87°C dargestellt. Es zeigt sich eine äußerst komplexe Schar von Differenzspektren mit großen Signalen im gesamten Spektralbereich. Die Amid I-Bande des Glycins (1645 cm^{-1}) weist die größten Differenzamplituden auf, die eine Verbreiterung der Bande und sinkende Maximalamplitude anzeigen. Interessant ist aber vor allem die Amid II-Bande des Glycins bei 1556 cm^{-1} , die als Indikator für das Aufschmelzen der Tripelhelix angesehen werden kann. Das Signal ist bei 55°C bereits verschwunden und dementsprechend sollte der Schmelzvorgang bei dieser Temperatur nahezu abgeschlossen sein.

Für die Auswertung müssen die Absorptionsänderungen, die durch das Schmelzen der Tripelhelix verursacht werden, von den thermisch induzierten Differenzsignalen getrennt werden. Hier hilft wieder die getrennte Betrachtung der Temperaturbereiche, deshalb werden die Spektren unterhalb und oberhalb von 55°C in je einem Diagramm dargestellt (Abb. 6.33(b)). Die generellen Unterschiede in der Form der Differenzbanden beider Bereiche sind offensichtlich.

55°C – 87°C In diesem Temperaturbereich liegt ein Zwei-Zustands-System vor, welches durch das Auftreten isosbestischer Punkte gekennzeichnet ist. Die größten Differenzsignale

ergeben sich im Amid I-Bereich durch die Verbreiterung und Absorptionsabnahme der zentralen Bande des Glycins (1645 cm^{-1} , vgl. S. 211 ff.). In den Differenzspektren erkennt man die charakteristische Signatur dieser Verbreiterung in der zentralen negativen Bande bei 1645 cm^{-1} die von zwei positiven, stark asymmetrischen Banden in den Bereichen von 1570 cm^{-1} bis 1627 cm^{-1} und oberhalb von 1655 cm^{-1} flankiert wird. Die positive Bande oberhalb von 1655 cm^{-1} erscheint zweigeteilt, da sie bei 1676 cm^{-1} durch die negative Amid I-Differenzbande der Proline überlagert ist. Deren Bleichsignal ist im Temperaturbereich unter 55°C eindeutig an dem negativen Signal bei 1672 cm^{-1} zu verifizieren (Abb. 6.33(b) oben). Ebenso lässt sich die Schulter der negativen Bande bei etwa 1630 cm^{-1} mit dem Ausbleichen der Amid I-Mode der Hydroxyproline erklären, die bei geringeren Temperaturen als Minimum bei 1632 cm^{-1} noch eindeutig zu erkennen ist.

Im Bereich der HDO-Beugeschwingung tragen sowohl die Erwärmung des HDO als auch des Peptides in etwa zu gleichen Teilen zu den Differenzspektren bei, wie ein Vergleich von Bandenstruktur und Amplitude mit Abbildung 6.30(b) ergibt. Aufgrund der unterschiedlichen Lösungsmittel der beiden Experimente lassen sich jedoch keine genauen Aussagen ableiten.

Kleinere Differenzsignale bei 1336 cm^{-1} (–) und 1312 cm^{-1} (+) zeigen die Rotverschiebung der $\delta(\text{C-H})$ -Bande. Im Bereich der Amid II-Bande ist kein Differenzsignal nachweisbar, da der H/D-Austausch für die Glycine bereits vollständig abgeschlossen ist.

9°C – 52°C Die thermisch induzierten Differenzspektren bei niedrigen Temperaturen sind wesentlich komplexer. Aus dem Fehlen isosbestischer Punkte lässt sich ableiten, dass kein Zwei-Zustands-System vorliegt. Die ab 55°C auftretenden Prozesse sind auch in diesen Spektren teilweise zu erkennen, werden aber offensichtlich durch zusätzliche Effekte überlagert.

Der H/D-Austausch führt zum Ausbleichen der Glycin-Amid II-Bande bei 1556 cm^{-1} . Dieser Prozess ist unterhalb von 25°C nicht zu beobachten, beschleunigt sich mit steigender Temperatur und ist bei 52°C abgeschlossen.

Bei Temperaturen von 9°C bis etwa 25°C müssen zusätzlich die spektralen Signaturen des HDO berücksichtigt werden. Die auftretende Konzentrationserhöhung von etwa 8 % korreliert mit der breitbandigen Absorptionszunahme unterhalb von 1500 cm^{-1} .

Die negativen Amid I-Banden des Glycins (1642 cm^{-1}) und Prolins (1632 cm^{-1}) sind etwa gleich stark, während bei hohen Temperaturen eindeutig das Signal der Glycine dominiert. Aufgrund der isolierten Peptidbanden in diesem Bereich ist ein Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, die Ursache muss also in der Temperaturabhängigkeit des Azocollagens selbst liegen.

Zwischen 1400 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} treten einige positive Absorptionsdifferenzen auf. Diese sind erst über 25°C deutlich zu erkennen und sie sind in den Differenzspektren oberhalb von 55°C nicht mehr enthalten. Ihre Temperaturabhängigkeit ähnelt also der der Amid II-Bande, so dass ein struktureller Zusammenhang zu vermuten ist. Eine eindeutige Zuordnung ist derzeit jedoch nicht möglich.

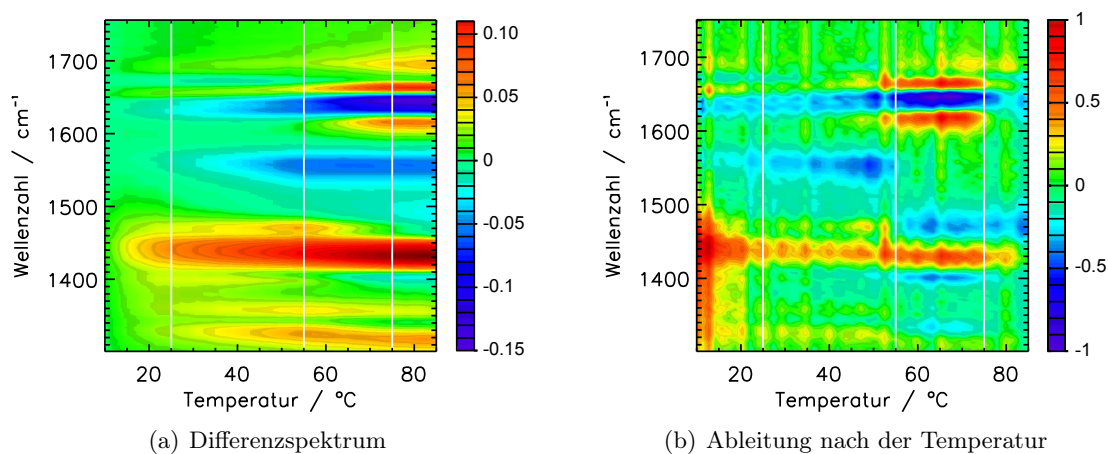


Abbildung 6.34: 2d-Grafiken der thermisch induzierten IR-Differenzspektren des Azocollagens: (a) zeigt die Differenzspektren bezogen auf das Referenzspektrum bei 9 °C (äquivalent zu Abb. 6.33(b)). In (b) ist die erste Ableitung der Absorption nach der Temperatur aufgetragen. Die weißen Balken markieren die Grenzen der im Text diskutierten Temperaturintervalle.

Fazit Die bisherigen Betrachtungen machen bereits deutlich, dass in den Temperaturbereichen 9 °C → 25 °C, 25 °C → 50 °C und 55 °C → 87 °C unterschiedliche Prozesse die Änderungen der Absorptionsspektren bestimmen. Diese Komplexität wird in der zweidimensionalen Darstellung der Differenzspektren und ihrer Ableitung nach der Temperatur (Abb. 6.34) besonders gut deutlich. Die Absorptionsänderung wurde direkt durch Subtraktion des Spektrums von 9 °C berechnet, die Ableitung wurde zusätzlich global normiert, die Darstellung der Werte ist farbkodiert gemäß der beigefügten Skalen.

In Bezug auf die Temperaturen fallen sofort die zuvor erwähnten Grenzwerte auf, die sich auch in den ausgewählten Schmelzkurven wiederfinden (Abb. 6.35): Unterhalb von 25 °C nimmt die breitbandige Absorption von HDO bei 1450 cm⁻¹ zu. Bei 55 °C ist der Austausch der Glycinprotonen abgeschlossen, das Signal in der Amid II-Bande bei 1556 cm⁻¹ erreicht sein Minimum und bleibt konstant. Das ist besonders in der Ableitung gut zu erkennen, die an diesem Punkt auf Null zurückgeht. Gleichzeitig verändern sich die Muster auch im Amid I-Bereich, wo nun positive Differenzbanden bei 1630 cm⁻¹ und 1680 cm⁻¹ deutlich hervortreten und die Amplituden der Ableitung signifikant zunehmen. Dasselbe Muster zeigt sich im Amid II-Bereich, wenn auch etwas weniger ausgeprägt. Eine weitere Zustandsänderung zeigt sich übrigens bei etwa 75 °C, diese soll hier jedoch nicht weiter erörtert werden.

Zwei mögliche Ursachen können für die in verschiedenen Spektralbereichen synchron auftretenden Veränderungen der Muster bei 55 °C diskutiert werden:

- Der H/D-Austausch am Glycin führt nicht nur zum Übergang der Amid II- zur Amid II'-Mode, sondern beeinflusst sämtliche Schwingungsfrequenzen die mit der N-D-Gruppe koppeln. Insbesondere sind also die Amid I-Mode des Glycins und die des Prolins, zu dem eine Wasserstoffbrückenbindung besteht, betroffen. Die Größe

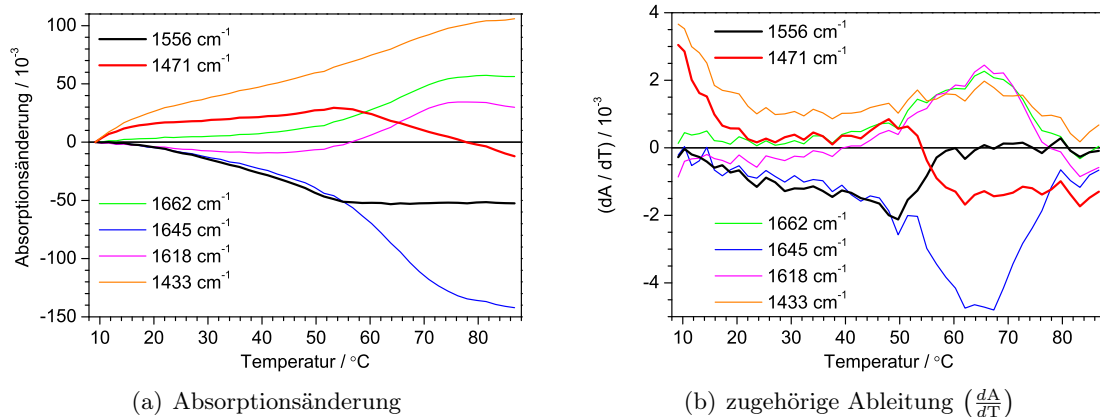


Abbildung 6.35: IR-Schmelzkurven im Bereich der Peptidbanden – Absorptionsänderungen bei verschiedenen charakteristischen Wellenzahlen bezogen auf das Referenzspektrum bei 9 °C (a). Bei 50 °C verändert sich der Kurvenverlauf, dies wird besonders beim Betrachten der ersten Ableitung der Kurven deutlich (b). Die großen Signaländerungen bei niedrigen Temperaturen beruhen auf der Entstehung von HDO durch den H/D-Austausch (vgl. Abb. 6.31, S. 218 und 6.32, S. 219).

des Effektes und des Spektralbereiches, in dem er auftritt, lassen diese Erklärung jedoch unwahrscheinlich erscheinen.

- Der H/D-Austausch aller Glycinreste kann erst erfolgen, nachdem die Collagen-Tripelhelix in die Monomere dissoziiert ist. Damit ändert sich nicht nur die chemische Umgebung der einzelnen Reste, es stehen auch mehr Freiheitsgrade in Bezug auf mögliche Konformationen zur Verfügung. Die simultane Veränderung der Signatur in verschiedenen Spektralbereichen ist dann nicht direkt durch den H/D-Austausch begründet, wird aber durch dieselbe Ursache – den Übergang zu den Monomeren – hervorgerufen.

Das Aufschmelzen der Collagen-Tripelhelix ist die einzig verbleibende Erklärung, die alle bisher präsentierten Beobachtungen konsistent erklärt: Mit zunehmender Temperatur steigt die Dissoziationsrate, was sich in einer immer schnelleren Abnahme der Absorption bei 1556 cm^{-1} widerspiegelt. Mit der Erwärmung verlagert sich das Gleichgewicht auf die Seite der Monomere, zudem nimmt die Wahrscheinlichkeit für Nebenreaktionen wie die *trans* → *cis*-Isomerisierung der Prolin-Peptidbindungen zu. Deswegen spielt die Rückreaktion, also die Assoziation des Collagens, bei hohen Temperaturen keine Rolle und die Dissoziationsrate nimmt mit der Erwärmung stetig zu, bis bei 55 °C keine intakten Tripelhelices mehr vorliegen.

Schmelzpunktbestimmung Das einfachste Reaktionsmodell für den Übergang zwischen der Collagen-Tripelhelix (T) und den entfalteten Monomeren (M) ist die Gleichgewichtsreaktion eines Zwei-Zustands-Systems:



Die Raten der Dissoziation und Assoziation bestimmen die Gleichgewichtslage und der Zustand des Systems kann durch die temperaturabhängige Gleichgewichtskonstante $K(T)$ des Massenwirkungsgesetzes beschrieben werden:

$$K(T) = \frac{[M]^3}{[T]} = \frac{3c_0^2(1 - F(T))^3}{F(T)} \quad (6.6)$$

Dabei ist c_0 die Gesamtkonzentration bezogen auf die Monomere und $F(T)$ der temperaturabhängige Anteil der tripelhelikalen Form. Als Schmelzpunkt T_m wird nun die Temperatur angenommen, bei der gerade die Hälfte der Monomere gefaltet, bzw. die Hälfte der Collagene dissoziiert vorliegt [405, 406]:

$$T = T_m \quad \Leftrightarrow \quad F(T) = 1/2 \quad (6.7)$$

Anhand spezifischer Markerbanden des Infrarotspektrums kann der Anteils an gefaltet vorliegenden Collagenen bestimmt werden. Hat man eine Differenzbande identifiziert, die mit der Entfaltung der Tripelhelix korreliert, dann ist die Temperatur, bei der die Hälfte dieser Änderung erfolgt ist, gleich der Schmelztemperatur. Typisch für die Schmelzkurven solcher Zwei-Zustands-Systeme ist ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Der Schmelzpunkt liegt dann am Wendepunkt, also am Punkt maximaler bzw. minimaler Steigung.

Zur Schmelzpunktbestimmung sind in dieser sehr einfachen Modellierung jedoch nur solche Differenzsignale geeignet, bei denen die spektrale Verschiebung und die Überlagerung mit weiteren Signalen ausgeschlossen bzw. vernachlässigt werden kann. In der zweidimensionalen Repräsentation der thermisch induzierten Differenzspektren und ihrer Ableitung zeigt sich, dass nur die Amid II-Bande bei 1556 cm^{-1} diese Voraussetzungen erfüllt. Sie liegt deutlich getrennt von allen übrigen Banden und ändert sich nur in ihrer Amplitude. Die Auswertung im Amid I-Bereich ist wegen der Überlagerung verschiedener Banden problematisch, dies wurde bereits dargestellt. Auch im Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} macht die Auswertung keinen Sinn. Hier sind zunächst der Anstieg der HDO-Bande und bei höheren Temperaturen ihre thermisch induzierten Änderungen der Collagenabsorption überlagert.

Abbildung 6.35 zeigt die Schmelzkurven und ihre Ableitung bei verschiedenen Wellenzahlen. Die Amid II- (1556 cm^{-1}) und die korrespondierende Amid II'-Bande (1471 cm^{-1}) des Glycins zeigen zwischen 25°C und 50°C einen nahezu linearen Verlauf, zwischen 50°C und 55°C ändert sich die Steigung, das Collagen ist vollständig entfaltet. Damit ist naheliegend, dass der Schmelzpunkt des vorliegenden Azocollagens in EG- d_6 :D₂O unterhalb von 55°C liegt. Die übrigen Kurven zeigen ebenfalls mehr oder weniger ausgeprägte Änderung der Steigung bei 55°C , doch würde man dort den Schmelzpunkt aufgrund des anschließenden sigmoidalen Kurvenverlaufes eher bei höheren Temperaturen vermuten.

Eine exakte Bestimmung des Schmelzpunktes kann aus mehreren Gründen nicht durchgeführt werden:

1. Voraussetzung ist die Gültigkeit der Reaktionsgleichung 6.5, also das Vorliegen eines thermodynamischen Gleichgewichtes. Die Gleichgewichtseinstellung wurde jedoch

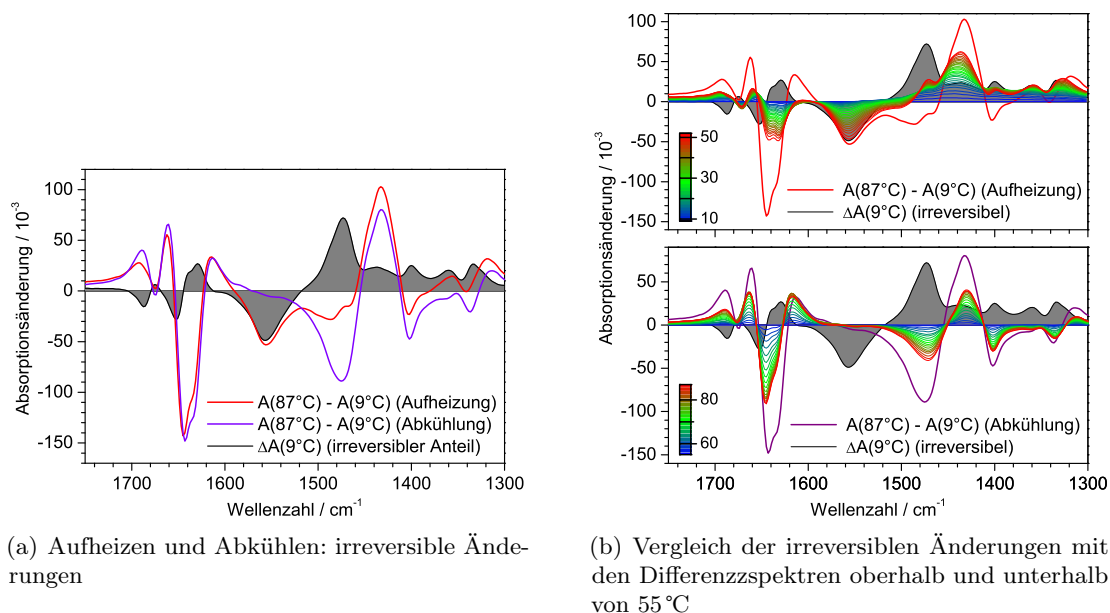
nicht abgewartet: Unmittelbar nach dem Erreichen einer eingestellten Temperatur wurde das Spektrum aufgenommen und danach wurde die Erwärmung fortgesetzt. Für vergleichbare Systeme haben sich mittlere Heizraten von $0,1\text{ °C}/\text{min}$ als zu hoch für eine Equilibrierung erwiesen [407], Gleichgewichtsexperimente benötigen eine Wartezeit von mehreren Stunden [406].

2. Die H/D-Austauschreaktion an den Glycinen ist irreversibel, eine Gleichgewichtseinstellung kann mit der entsprechenden Bande also grundsätzlich nicht verfolgt werden.
3. Die hier beobachtete Entfaltung der Tripelhelix ist – zumindest teilweise – nicht reversibel, wie die UV/vis-Absorptionsspektren vor und nach dem Aufheizen zeigen. Falls beispielsweise Nebenreaktionen auftreten oder die Rückreaktion kinetisch gehemmt sind, dann ist die Angabe eines Schmelzpunktes problematisch.

Irreversibles IR-Differenzspektrum Im infraroten Spektralbereich ergeben sich nach dem Aufheizen ebenfalls residuale Differenzsignale. Abbildung 6.36(a) zeigt Differenzspektren für das Aufheizen und die anschließende Abkühlung zwischen 9 °C und 87 °C . Die Differenz beider Spektren ist in grau hinterlegt und diese repräsentiert die mit dem Aufheizen verbundenen, irreversiblen Prozesse wie beispielsweise den H/D-Austausch. Dieses Spektrum ist nicht durch temperaturbedingte Bandenverschiebungen gestört und zeigt folgendes:

- Die größten Differenzbanden verursacht der H/D-Austausch am Glycin. Die ausgebleichte Amid II-Bande der Glycine liegt bei 1556 cm^{-1} und die korrespondierende positive Amid II'-Produktbande bei 1471 cm^{-1} . Sie schiebt bei Erwärmung zu niedrigeren Wellenzahlen.
- Die breitbandige positive Absorptionsdifferenz unterhalb von 1500 cm^{-1} kann der Beugeschwingung des entstandenen HDO zugeordnet werden.
- Kleinere, strukturierte Differenzbanden im Bereich der Amid I-Mode sowie der C–N-Streckschwingung und der C–H-Deformationsschwingungen sind mit strukturellen Änderungen insbesondere mit dem Aufschmelzen der tripelhelikalen Struktur verbunden.

Die nach dem Abkühlen noch vorhandenen Differenzsignale lassen sich mit den thermisch induzierten Differenzspektren im Bereich von 9 °C bis 52 °C bzw. von 55 °C bis 87 °C vergleichen (Abb. 6.36). Bei hohen Temperaturen (untere Grafik) zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit dem Differenzspektrum beim Abkühlen, also dem reversiblen Prozess. Das in grau hinterlegte irreversible Differenzspektrum hat keine Gemeinsamkeit mit der gezeigten Kurvenschar, also tragen die in diesem Temperaturbereich auftretenden Prozesse nicht zur Bildung des irreversiblen Zustands bei. Die dafür verantwortlichen Vorgänge laufen bei niedrigeren Temperaturen ab, sind jedoch von dem reversiblen Aufheizprozess überlagert. Das kann beispielsweise an der Amid II'-Bande des Glycins



(a) Aufheizen und Abkühlen: irreversible Änderungen

(b) Vergleich der irreversiblen Änderungen mit den Differenzspektren oberhalb und unterhalb von 55°C

Abbildung 6.36: Beim Aufheizen (9°C → 87°C) und anschließenden Abkühlen (87°C → 9°C) ergeben sich beim ersten Durchlauf irreversible spektrale Änderungen (a). Diese lassen sich überwiegend auf den H/D-Austausch zurückführen. Dieser Prozess findet unterhalb von 50°C statt, die thermisch induzierten Differenzspektren bei höheren Temperaturen tragen nicht dazu bei (b).

nachvollzogen werden: zunächst ist bei 1471 cm⁻¹ ein Anwachsen der Absorption zu beobachten, bei etwa 50°C erreicht die Bande ein Maximum und nimmt bei weiterer Erwärmung wieder ab. Grund ist die Überlagerung der irreversiblen Absorptionzunahme infolge des H/D-Austausches mit der reversiblen Rotverschiebung der Absorptionsbande von 1475 cm⁻¹ nach 1432 cm⁻¹ bei Erwärmung.

Zusammenfassung und Interpretation der stationären Messungen

In diesem Abschnitt wurden die im UV/vis- und IR-Bereich durchgeführten Gleichgewichtsmessungen präsentiert. Neben der Optimierung der Bedingungen für die transiente Infrarotspektroskopie und einer umfangreichen Bandenzuordnung ergeben sich daraus bereits wichtige Informationen über die Probe und ihre Strukturodynamik:

- Unmittelbar nach dem Ansetzen der Probe lag diese in tripelhelikaler Form vor.
- Bei Erwärmung kommt es zu einem H/D-Austausch, zunächst von Lösungsmittel-exponierten Protonen, bei hohen Temperaturen auch von den geschützten Glycin-Protonen. Bei 55°C ist dieser Prozess abgeschlossen. Damit ist nachgewiesen, dass es zu einer thermischen Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Monomere kommt.

- Schon unterhalb von 55 °C ergeben sich sowohl im UV/vis-, als auch im IR-Bereich irreversible spektrale Änderungen. Im UV/vis-Spektrum wurden diese auch nach einer thermischen Relaxation über mehrere Tage vorgefunden.
- Das Erwärmen führt zusätzlich zu reversiblen Verschiebungen im IR-Absorptionsspektrum des Azocollagens. Entsprechende Effekte sind ggf. in den zeitaufgelösten Messungen zu berücksichtigen.
- Bei Temperaturen unterhalb von 50 °C führt eine UV-Belichtung zu deutlich geringeren Isomerisierungsquantenausbeuten als beim isolierten Azoschalter.
- Nach dem Aufschmelzen der Tripelhelix, oberhalb von 50 °C, lassen sich mit der UV-Belichtung deutlich größere Isomerisierungsquantenausbeuten erzielen.

Wahrscheinlich ist, dass eine lichtinduzierte Isomerisierung des Azoschalters bei einer korrekt gefalteten Tripelhelix aufgrund der sterischen Beanspruchung verhindert wird. Die Natur des irreversiblen Reaktionsproduktes ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Möglicherweise führt die sehr hohe Konzentration zur Bildung ungeordneter Strukturen. Außerdem kann es bei hohen Temperaturen in den Monomeren zur *trans* → *cis*-Isomerisierung der Peptidbindungen von Prolinen und Hydroxyprolinen kommen, was eine Rückfaltung in die Collagen-Tripelhelix ebenfalls stark verlangsamen würde.

Darüberhinaus könnten die Collagene nach dem Ansetzen der Probe bei Raumtemperatur in größeren ungeordneten Strukturen vorliegen, vergleichbar mit den Fibrillen natürlicher Collagene. Für vergleichbare Modellcollagene wird eine solche Selbstassoziation berichtet[408]: Ein Peptid mit der Sequenz (Gly-Pro-Hyp)₁₀ zeigt ab einer Konzentration von 1 mM eine Aggregation, die der Bildung von Fibrillen in natürlichen Collagenen ähnelt. Diese benötigt einen Nukleationskeim und die Aggregationsrate steigt mit der Temperatur. Der Schmelzpunkt der aggregierten Form wurde mit 25 °C angegeben. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch hier eine derartige Quartärstruktur vorliegt, welche die irreversiblen spektralen Differenzen hervorruft.

6.6.4 Transiente IR-Differenzspektren der *trans* → *cis*-Isomerisierung

Die Bedingungen der zeitaufgelösten Experimente beruhten auf der ursprünglichen Interpretation der Gleichgewichtsmessungen [375]. Danach sollte die lichtinduzierte *trans* → *cis*-Isomerisierung des gekoppelten Azoschalters eine – zumindest partielle – Entfaltung der Tripelhelix auslösen, welche reversibel ist. Der Schmelzpunkt wurde anhand von Zirkulardichroismus-Spektren und der bei 1645 cm⁻¹ im Infraroten erhaltenen Schmelzkurve zu 55 °C bestimmt. Zusammen mit den bei 50 °C signifikant größeren Differenzamplituden der photostationären Zustände wurde gefolgert, dass die thermische Destabilisierung der Collagen-Tripelhelix kurz unterhalb des Schmelzpunktes bei 50 °C eine effiziente lichtinduzierte Entfaltung ermöglicht. Um diese Entfaltung zu beobachten, wurden die zeitaufgelösten Messungen ebenfalls bei 50 °C durchgeführt.

Die erneute Analyse aller Gleichgewichtsmessungen hat nun ergeben, dass bei 50 °C keine tripelhelikalen Strukturen mehr vorliegen: Aufgrund der hohen Entfaltungsrate ist

mit der vollständigen Dissoziation noch vor dem Beginn der eigentlichen Messung zu rechnen. Damit sollten diese Messungen die Reaktion der Monomere auf die Absorption des Anregungslichtes darstellen, während sich ein Einfluss der Tertiärstruktur nur bei niedrigen Temperaturen zeigt. Im Folgenden werden daher zunächst die bei 50 °C gemessenen Daten der Monomere und im Anschluss die bei niedrigeren Temperaturen durchgeführten Messungen präsentiert.

Untersuchung der Monomere bei 50 °C

Vorbemerkungen Es wurde der Spektralbereich von 1298 cm⁻¹ bis 1685 cm⁻¹ untersucht. Dieser wurde mit insgesamt vier Messungen abgedeckt: für Wellenzahlen kleiner 1530 cm⁻¹ wurde Gitter 3 ($d = 75/\text{mm}$) eingesetzt, ansonsten Gitter 2 ($d = 150/\text{mm}$). Zur Anregung wurde die SFG bei 330 nm mit 600 nJ Pulsenergie eingesetzt, die Polarisationen von Anreg- und Abtastlicht standen im magischen Winkel zueinander. Während der Messung wurde die Probe konstant auf einer Temperatur von 50 °C und im photostationären Gleichgewicht der *trans*-Form gehalten (vgl. S. 200). Die Datenerfassung erfolgte im unreferenzierten Modus.

Alle weiteren Details der Auswertung sind identisch mit der Auswertung der Messung des Azoschalters (S. 172 ff.).

Ergebnisse Abbildung 6.37 zeigt die 2d-Darstellung der transienten Absorptionsänderungen. Die zeitliche Abfolge der auftretenden Effekte ist wieder folgende: 1. vor dem Zeitnullpunkt: gestörter freier Induktionszerfall, 2. um den Zeitnullpunkt: Störung durch die Kreuzphasenmodulation, 3. nach dem Zeitnullpunkt: Rotverschiebung der Schwingungsbanden aufgrund der elektronischen Anregung und Zerfall dieser Differenzsignale aufgrund der auftretenden Relaxationsprozesse. Die instantan erscheinenden Signale zerfallen auf der Zeitskala von etwa 10 ps, wie es auch beim freien Azoschalter der Fall ist. Die Differenzbanden weisen wieder unterschiedlich ausgeprägte spektrale Verschiebungen auf und bei langen Verzögerungszeiten bleibt ein kleines Differenzspektrum bestehen. Dieses Abklingverhalten kann am besten in den transienten Spektren in Abbildung 6.38 nachvollzogen werden.

Nahezu alle auftretenden Bleichsignale zeigen die Signatur des gestörten freien Induktionszerfalls, was die eindeutige Zuordnung zu den Schwingungsmoden des Azoschalters erlaubt. Einzige Ausnahme ist eine kleine negative Differenzbande bei 1350 cm⁻¹. Dieses Bleichsignal erscheint unmittelbar am Zeitnullpunkt und folgt anscheinend derselben Zerfallskinetik wie die übrigen transienten Differenzbanden. Beim freien Azoschalter tritt bei 1356 cm⁻¹ eine vergleichbare Bande auf ($\gamma_w(\text{C-H}_2)$ -Mode), bei der die PFID-Signatur ebenfalls nicht nachweisbar ist. Daher wird das Signal bei 1350 cm⁻¹ ebenfalls der $\gamma_w(\text{C-H}_2)$ -Mode des gekoppelten Azoschalters zugeordnet.

Sowohl die einzelnen Differenzsignale, als auch ihre Zerfallskinetik zeigen also eine große Ähnlichkeit mit den Ergebnissen der *trans* → *cis*-Isomerisierung des Azoschalters (Abb. 6.12, S. 174). Auf eine ausführliche Beschreibung und Interpretation der auftretenden Effekte kann daher verzichtet werden, es wird auf Abschnitt 6.5.3 ab S. 174 verwiesen.

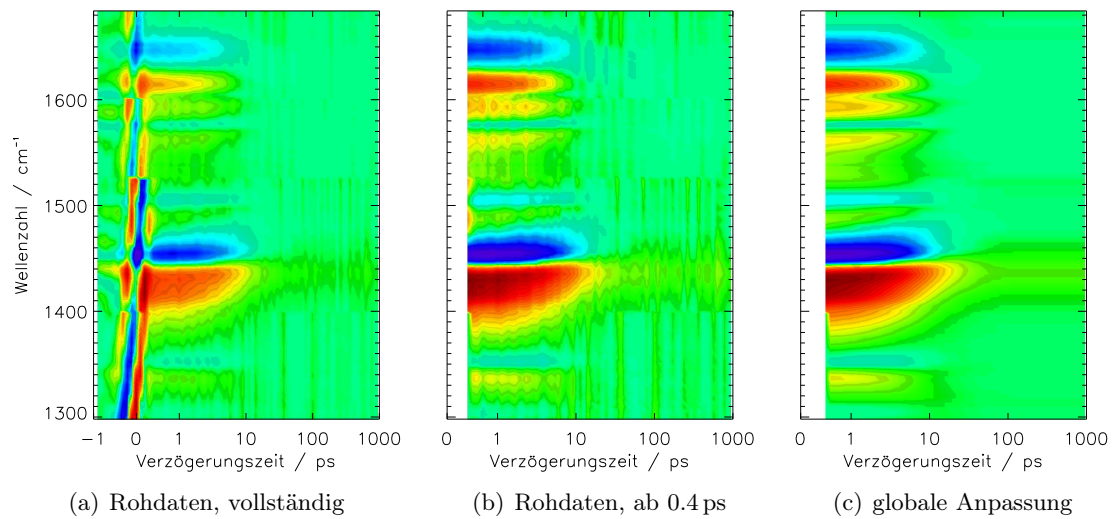


Abbildung 6.37: Transiente Absorptionsänderung des Azocollagens bei 50 °C nach Anregung bei 330 nm (*trans* → *cis*) bestehend aus vier Einzelmessungen mit Abtastung im magischen Winkel. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. In (a) ist die PFID-Signatur vor dem Zeitnullpunkt sowie die um den Zeitnullpunkt dominierende Kreuzphasenmodulation deutlich zu erkennen. In Abb. (b) wird nur der Zeitbereich ab 0.4 ps dargestellt, was zu einer etwas besseren Farbskala führt. Im Zeitbereich von 0.5 ps bis 1.8 ns wurde eine globale Analyse durchgeführt. (c) zeigt das Ergebnis für die Anpassung mit 4 exponentiellen Zerfallsfunktionen.

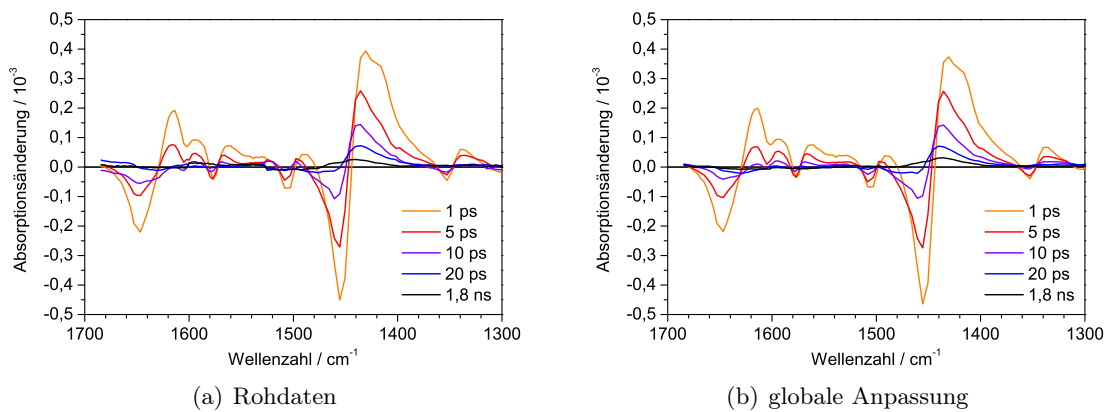


Abbildung 6.38: Transiente Differenzspektren des Azocollagens (*trans* → *cis*, 50 °C) zu ausgewählten Verzögerungszeiten. In (a) sind die unverarbeiteten Daten dargestellt. Zum Vergleich werden in (b) dieselben Spektren nach der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten wiedergegeben.

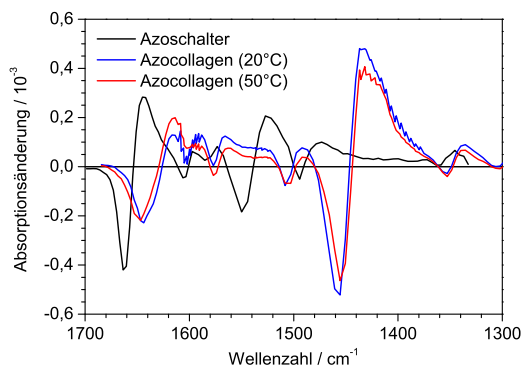


Abbildung 6.39: Vergleich der transienten Spektren bei *trans* → *cis*-Isomerisierung des freien Azoschalters in $\text{DMSO-}d_6$ bei Raumtemperatur und des Azocollagens in $\text{EG-}d_6:\text{D}_2\text{O}$ bei 20°C und 50°C nach 1 ps.

Es folgt eine Darstellung einiger markanter Unterschiede zur Messung des ungekoppelten Azoschalters. Diese lassen sich anhand der transienten Spektren am besten verdeutlichen. In Abbildung 6.39 sind die Differenzspektren bei einer Verzögerungszeit von 1 ps des isolierten Azoschalters in $\text{DMSO-}d_6$ bei ca. 20°C und des Azocollagens in $\text{EG-}d_6:\text{D}_2\text{O}$ bei 20°C und 50°C zusammengefasst.

Die größten Unterschiede zwischen dem freien und dem gekoppelten Azoschalter zeigen sich in der Lage und Amplitude der Amid II-Bande. Aufgrund des H/D-Austausches liegt das zugehörige Bleichsignal der Amid II'-Bande beim Azocollagen bei 1456 cm^{-1} während es beim undeutierten Azoschalter bei 1550 cm^{-1} auftritt.

Die Amplitudenverhältnisse vom Amid I- zum Amid II bzw. Amid II'-Bereich haben sich dabei von etwa (2:1) beim Azoschalter zu (1:2) beim Azocollagen umgekehrt. Das liegt zum einen an der Verbreiterung der Amid I-Differenzsignale (s. u.), aber auch an der starken Vergrößerung der transienten Differenzbanden der Amid II'-Mode im Vergleich zur Amid II-Mode des isolierten Azoschalters. Im gekoppelten System dominiert die Amid II'-Bande die transienten Differenzspektren, über die genaue Ursache kann jedoch nur spekuliert werden. Wahrscheinlich führt die sterische Einschränkung durch die Anbindung an die Collagensequenz zu einer anderen Konformation der Peptidbindungen des Azoschalters. Das sollte sich wiederum auf die Kopplung von elektronischer Anregung und Amid II'-Mode auswirken. Andere Erklärungsansätze sind, dass die von der $\delta(\text{N-D})$ -Schwingung entkoppelte $\nu(\text{C-N})$ -Mode entweder ein größeres Übergangsdipolmoment als die Amid II-Mode besitzt bzw. stärker auf die elektronische Anregung reagiert oder dass die Kopplungen der $\nu(\text{C-N})$ -Mode mit anderen Schwingungen eine Rolle spielen.

Die ausgebleichte Amid I-Bande des Azoschalters ist im Azocollagen um 20 cm^{-1} rotverschoben und besitzt mit 24 cm^{-1} beinahe die doppelte Halbwertsbreite der Amid I-Bande des Azoschalters (13 cm^{-1}). Das spektrale Integral ist jedoch identisch, was die Abnahme der Differenzamplituden auf die Hälfte erklärt. Ursache der Rotverschiebung sind Wasserstoffbrückenbindungen der Peptidgruppe zum Lösungsmittel $\text{EG-}d_6:\text{D}_2\text{O}$, welche die Schwingungsfrequenz typischerweise um 20 cm^{-1} absenken [49, 397]. Die

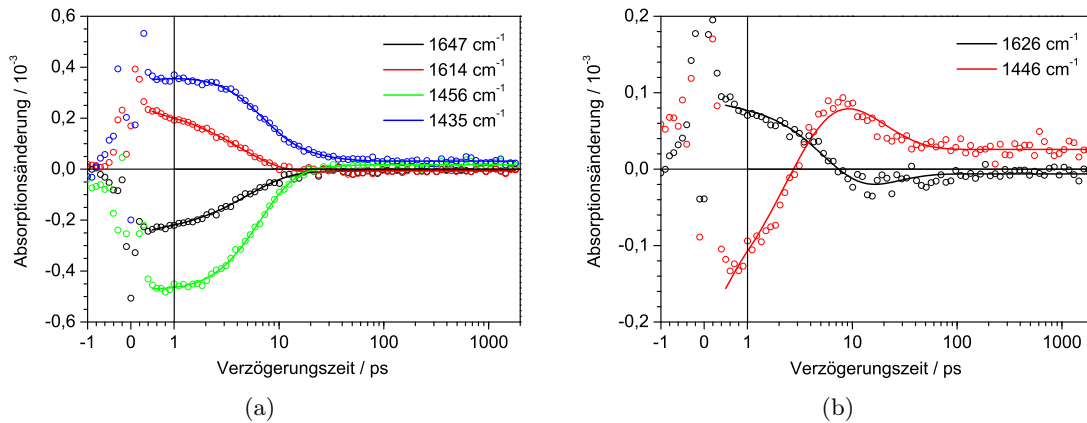


Abbildung 6.40: Transienten des Azocollagens (*trans* \rightarrow *cis*, 50°C) bei ausgewählten Wellenzahlen. Die einzelnen Signale wurden entsprechend ihrer Amplitude in zwei getrennten Diagrammen dargestellt. Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten als Linie dargestellt. Bei den kleinen Signalen an den Schultern der Differenzbanden ist das nicht monoexponentielle Verhalten deutlich erkennbar.

größere Bandbreite ist auf eine heterogene Linienverbreiterung zurückzuführen. Es kann allerdings nicht geklärt werden, ob unterschiedlich starke Wasserstoffbrücken oder verschiedene Konformationen der Amidbindung des gekoppelten Systems diesen Effekt verursachen.

Die übrigen ausgebleichten Schwingungsbanden, also Phenyl- und $\delta(\text{C-H}_2)$ -Moden des gekoppelten Azoschalters sind ebenfalls um einige Wellenzahlen verschoben. Ein direkter Einfluss des Lösungsmittels besteht hier nicht, da diese Gruppen keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Allerdings zeigte sich bei der Normalmodenanalyse des Azoschalters, dass diese Moden an die N-H-Beugeschwingung der Peptidgruppe koppeln (vgl. Abschnitt 6.5.2, S. 170 ff.). Deshalb ist nach der Deuterierung der Amidgruppen auch für diese Schwingungsmoden eine Frequenzverschiebung zu erwarten.

Wie bei der Messung der *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung des freien Azoschalters erfährt die Amid II'-Differenzbande während des Zerfalls eine signifikante Blauverschiebung. Ursache ist die Schwingungsenergieumverteilung bzw. die Änderung der molekularen Temperatur bei der Relaxation. Diese spektrale Verschiebung ist bei den übrigen Signalen ist weit weniger ausgeprägt, insbesondere die transiente Amid I-Bande ändert ihre Lage kaum.

Auf langen Verzögerungszeiten bleibt wieder das Differenzspektrum einer langlebigen Spezies bestehen, deren Amplituden sind ab ca. 50 ps praktisch konstant. Dieses wird im Rahmen der globalen Analyse genauer betrachtet.

Globale Analyse

Wie beim freien Azoschalter erforderte die optimale globale Anpassung die Verwendung von vier Zerfallskomponenten, von denen eine festgesetzt wurde ($\tau_4 := \infty$). Die

ausgewählten Transienten aus dem Amid I- und dem Amid II'-Bereich zeigen die gute Anpassung der Signale mit den gefundenen Parametern (Abb. 6.40). Die unterschiedliche Zerfalldynamik in diesen beiden Differenzbanden sowie die Transienten auf den Flanken der Differenzsignale belegen die Notwendigkeit einer multiexponentiellen Anpassung. Die Transienten auf den Extrema der Differenzbanden (z. B. 1456 cm^{-1} und 1435 cm^{-1}) können zwar monoexponentiell mit Zeitkonstanten von etwa 8 ps beschrieben werden, veränderliche Positionen oder Breiten der Differenzbanden werden dabei jedoch nicht berücksichtigt.

Bei einer monoexponentiellen Anpassung erhält man also die gleichen Zeitkonstanten für den Zerfallsprozesses wie für den freien Azoschalter. Dieser geringe Einfluss der Peptidsequenz auf die Dynamik des Azoschalters wurde ebenso bei der Analyse der transienten Spektren beider Proben im sichtbaren Spektralbereich gefunden [375]. Auch diese Messungen zeigen nur geringe Unterschiede in der Zerfalldynamik des gekoppelten und des isolierten Azoschalters und die globale Analyse ergab für das Azocollagen Werte von $\tau_1 < 0,2\text{ ps}$, $\tau_2 = 0,4\text{ ps}$, $\tau_3 = 6,4\text{ ps}$ und für den Azoschalter von $\tau_1 = 0,15\text{ ps}$, $\tau_2 = 0,4\text{ ps}$, $\tau_3 = 4,7\text{ ps}$. Die Ankopplung des Schalters an die Collagen-Peptidsequenz hat also nur geringe Auswirkungen auf die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands.

Aus der globalen Analyse der Messungen im MIR wurden folgende Zeitkonstanten bestimmt: $\tau_1 = 2,4\text{ ps}$, $\tau_2 = 3,9\text{ ps}$, $\tau_3 = 17\text{ ps}$. Diese Werte liegen im Bereich, der *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung des freien Azoschalters ($\tau_1 = 1,4\text{ ps}$, $\tau_2 = 5,6\text{ ps}$, $\tau_3 = 9,3\text{ ps}$), wobei alle Zeitkonstanten etwas variieren. Die zerfallassozierten Spektren unterscheiden sich ebenfalls im Detail: Die Komponenten τ_1 und τ_2 weisen nahezu spiegelbildliche Amplituden auf und modulieren so das nicht-exponentielle Verhalten. Im Bereich der positiven Amid II'-Differenzbande zeigt sich dieser Effekt besonders deutlich: Das Signal ist in den ersten drei Pikosekunden praktisch konstant – die Anpassung erfordert zwei sich kompensierende Komponenten. Diese Kompensation führt zu den überaus großen Amplituden der zerfallassozierten Spektren von τ_1 und τ_2 , so dass das DAS zu τ_3 dagegen verschwindend klein erscheint. An dieser Stelle kann die Frage, ob τ_3 die auf längeren Zeitskalen erwartete Antwort der Collagen-Peptidsequenz auf die Anregung des Chromophors darstellt, noch nicht beantwortet werden.

Trotzdem ergibt sich für die Zerfallsprozesse insgesamt wieder dieselbe Interpretation wie für den Azoschalter in DMSO- d_6 : nach der elektronischen Anregung kommt es zur schnellen elektronischen Relaxation in den $S_1(n\pi^*)$ -Zustand. Der Übergang in den elektronischen Grundzustand erfolgt dann auf der Zeitskala einiger Pikosekunden. Bei beiden Relaxationsprozessen wird die Energie durch intramolekulare Schwingungsenergieumverteilung an die niederfrequenten Schwingungsmoden des Moleküls und schließlich an die Lösungsumgebung abgegeben. Diese Kühlprozesse und ihr Einfluss auf das Spektrum wurden bereits bei der Interpretation der *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektren des Azoschalters (Abschnitt 6.5.3, S. 181) detailliert dargestellt. Es kann nicht geklärt werden, inwiefern Veränderungen der Zeitkonstanten oder der zerfallassozierten Spektren auf die Ankopplung an das Peptid, die damit verbundene Konformationsänderung oder den Einfluss des Lösungsmittels zurückzuführen ist.

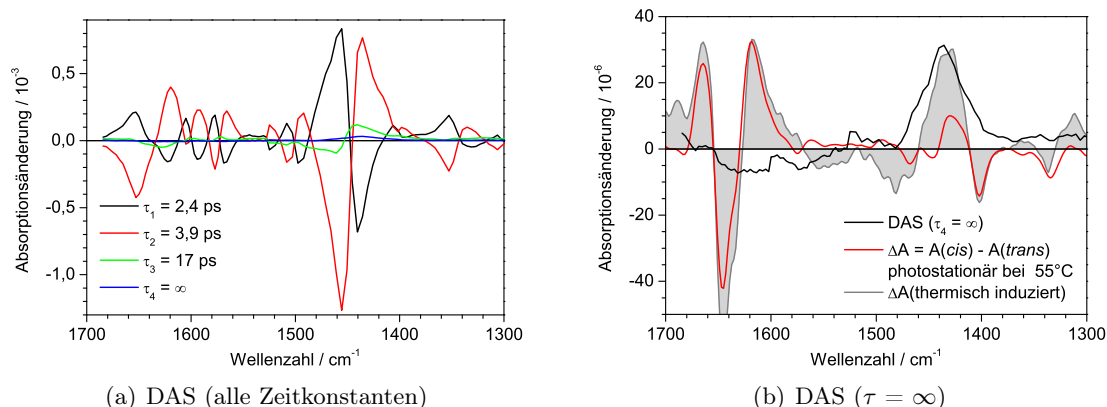


Abbildung 6.41: Zerfallasoziierte Spektren des Azocollagens (*trans* \rightarrow *cis*, 50°C) für die globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten (a). Die konstante Komponente ($\tau = \infty$) wird in (b) dargestellt. Zum Vergleich sind das *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektrum der photostationären Gleichgewichte bei 55°C (Abb. 6.27(b), S. 207) und ein interpoliertes Differenzspektrum für $\Delta T = 0,02^\circ\text{C}$ bei einer Temperatur von 55°C enthalten.

Das auf langen Zeiten praktisch konstante Signal macht im Maximum etwa 5% der Amplitude der instantan auftretenden Differenzbanden aus. Abbildung 6.41(b) zeigt das zerfallasoziierte Spektrum der entsprechenden Komponente $\tau_4 = \infty$ zusammen mit dem *trans* \rightarrow *cis*- und einem wärmeinduzierten Differenzspektrum bei 55°C. Letzteres wurde durch Skalierung des Differenzspektrums zwischen 57°C und 55°C berechnet und entspricht einer Temperaturänderung von $0,02^\circ\text{C}$ – lineares Verhalten vorausgesetzt. Zwar reproduziert die Langzeitkomponente keines der beiden stationären Spektren exakt, allerdings kann sich in den 1,8 ns auch noch keine neue Gleichgewichtsverteilung einstellen. Aufgrund der geringen Isomerisierungsquantenausbeute erscheint die Erwärmung als Ursache dieses Signals wahrscheinlicher. Für den Azoschalter wurde eine Aufheizung von $0,05^\circ\text{C}$ bei vollständiger Umwandlung der absorbierten Photonenenergie in Wärme abgeschätzt, so dass die hier dargestellte Temperaturdifferenz realistisch erscheint.

Im Bereich der Amid I-Bande ist kaum eine Struktur im τ_4 -Spektrum zu erkennen, es gibt keine Ähnlichkeit mit dem licht- oder dem thermisch induzierten Differenzspektrum. Die stationären Differenzspektren zeigen dort das Ausbleichen der Amid I-Mode des Glycins, was innerhalb von 1,8 ns nach der Anregung offensichtlich noch nicht beobachtet wird. Allerdings können aufgrund der sehr kleinen Signale auch experimentelle Randbedingungen die Ursache der nicht aufgelösten Strukturen bei sein – insbesondere da die Probenkammer auf 50°C aufgeheizt wurde. Insofern kann hier keine definitive Feststellung getroffen werden.

Fazit Die transienten IR-Differenzspektren des Azocollagens bei 50°C zeigen ausschließlich Differenzbanden, welche den Schwingungsmoden des Azoschalters zuzuordnen sind. Die Veränderungen von Position und Breite dieser Signale im Vergleich zum

ungekoppelten System beruhen dem Wechsel des Lösungsmittels und dem damit verbundenen H/D-Austausch, sowie den sterischen Einschränkungen durch die Bindung an die Collagen-Peptidsequenz. Die beobachtete Zerfallskinetik entspricht der des freien Azoschalters, was mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Spektralbereich übereinstimmt. Das bei langen Verzögerungszeiten beobachtete Differenzspektrum kann tendenziell mit einem Temperatursprung von etwa $0,02^\circ\text{C}$ in der Küvette nach der vollständigen Umverteilung der Photonenenergie erklärt werden. Ein Einfluss der Peptidstränge auf die beobachtete Dynamik der Chromophorschwingungen kann nicht nachgewiesen werden. Dies war auch nicht zu erwarten, da bei dieser Temperatur keine Tripelhelices mehr vorliegen. Zudem steht genug thermische Energie zur Besetzung vielfältiger Konformationen sowie für die *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung der Prolin-Amidbindungen zur Verfügung.

Messung der Collagen-Tripelhelix bei 20°C

Vorbemerkungen Es wurde der Spektralbereich von 1298 cm^{-1} bis 1685 cm^{-1} untersucht. Dieser wurde mit insgesamt vier Messungen abgedeckt: Für Wellenzahlen kleiner 1530 cm^{-1} wurde Gitter 3 ($d = 75/\text{mm}$) eingesetzt, ansonsten Gitter 2 ($d = 150/\text{mm}$). Zur Anregung wurde die SFG bei 330 nm mit einer Pulsenergie von 600 nJ verwendet, die Polarisationen von Anreg- und Abtastlicht standen im magischen Winkel zueinander. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur im photostationären Gleichgewicht der *trans*-Form (vgl. S. 200). Die Datenerfassung erfolgte im unreferenzierten Modus.

Ergebnisse Abbildung 6.42 zeigt eine Übersicht der transienten Absorptionsänderungen nach Anregung der Azoschalter der bei 20°C intakten Collagen-Tripelhelices. Auf kurzen Zeiten dominieren erwartungsgemäß die Schwingungsbanden des Azoschalters, die durch die elektronische Anregung gestört wurden. In diesem Bereich sind die Signale und ihre Kinetik weitgehend identisch mit den bei 50°C gemessenenen.

In Abbildung 6.39 können die transienten Spektren nach 1 ps aus beiden Datensätzen direkt verglichen werden, hier ist nur ein geringer Einfluss der Erwärmung auf die Position der Banden sichtbar: Die Amid I-Bande ist bei 50°C um ca. 4 cm^{-1} blauverschoben, was vermutlich auf die geschwächten Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist [49]. Im Gegensatz dazu weist die Amid II'-Bande eine Rotverschiebung von ca. 4 cm^{-1} auf, Linienform und -breite bleibt jedoch in beiden Fällen erhalten. Alle übrigen Differenzbanden zeigen nach 1 ps keine signifikante Temperaturabhängigkeit.

Die Zerfallskinetik entspricht in den ersten Pikosekunden ebenfalls der Messung der Monomere bei 50°C mit zerfallenden und dabei teilweise schiebenden Differenzbanden. Deutliche Unterschiede in der Kinetik bei beiden Temperaturen lassen sich vor allem bei längeren Verzögerungszeiten erkennen, da bei Raumtemperatur insbesondere im Bereich der Amid I-Mode größere Differenzsignale und zusätzliche, langsamere Zerfallskomponenten auftreten. Die transienten Differenzspektren (Abb. 6.43) zeigen bereits nach 5 ps eine Schulter im ausgebleichten Amid I-Bereich. Im Differenzspektrum nach 20 ps ist das negative Signal der Amid I-Bande des Azoschalters weitgehend zurückgegangen und eine

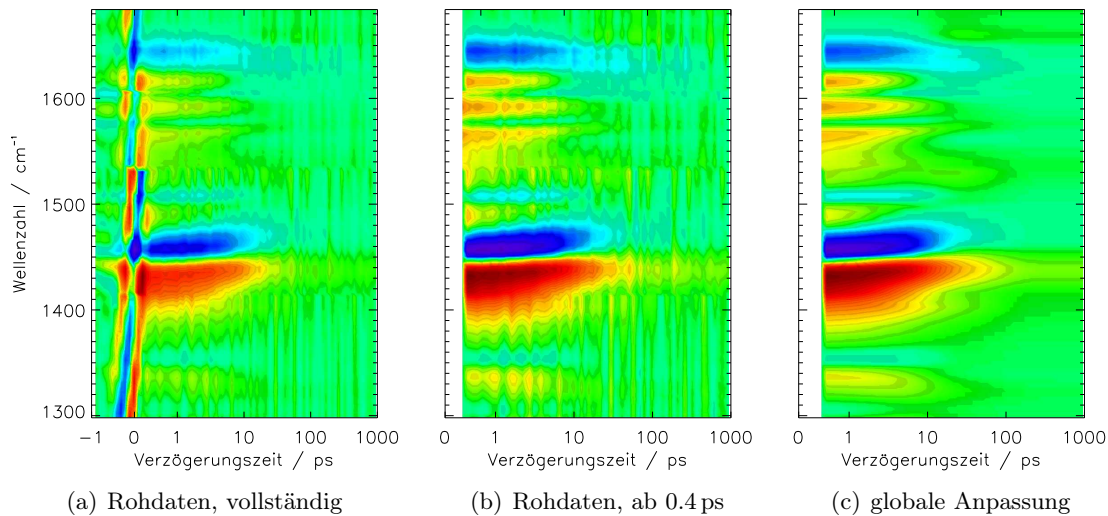


Abbildung 6.42: Transiente Absorptionsänderung des Azocollagens bei 20°C nach Anregung bei 330 nm (*trans* \rightarrow *cis*) bestehend aus vier Einzelmessungen mit Abtastung im magischen Winkel. Die Zeitachse ist linear bis 1 ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. In (a) ist die PFID-Signatur vor dem Zeitnullpunkt sowie die um den Zeitnullpunkt dominierende Kreuzphasenmodulation deutlich zu erkennen. In Abb. (b) wird nur der Zeitbereich ab 0.4 ps dargestellt, was zu einer etwas besseren Farbskala führt. Im Zeitbereich von 0.5 ps bis 1.8 ns wurde eine globale Analyse durchgeführt. (c) zeigt das Ergebnis für die Anpassung mit 4 exponentiellen Zerfallsfunktionen.

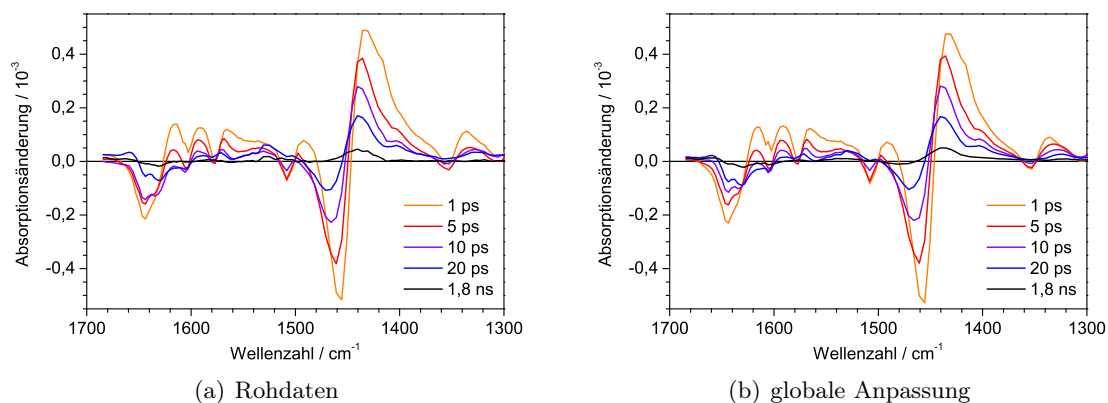


Abbildung 6.43: Transiente Differenzspektren des Azocollagens (*trans* \rightarrow *cis*) zu ausgewählten Verzögerungszeiten. In (a) sind die unverarbeiteten Daten dargestellt. Zum Vergleich werden in (b) dieselben Spektren nach der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten wiedergegeben.

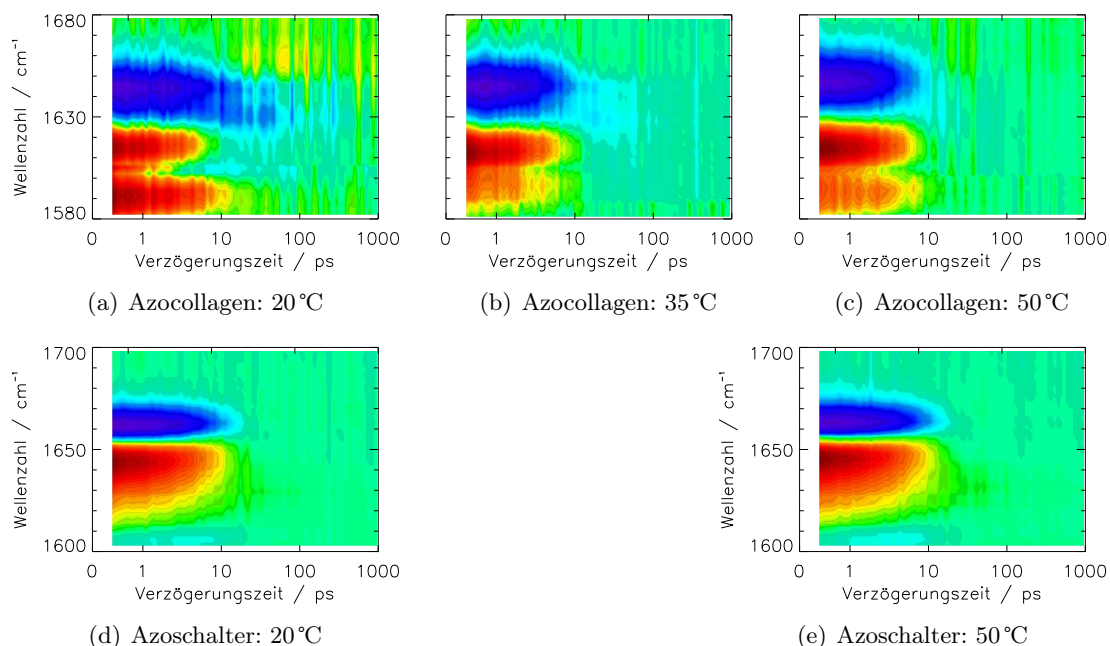


Abbildung 6.44: Azoschalter und -collagen: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der transienten Absorption im Amid I-Bereich (2d-Grafik)

strukturierte Bleichbande mit Minima bei 1644 cm^{-1} und 1632 cm^{-1} wird sichtbar. Auch nach langen Verzögerungszeiten sind die Differenzamplituden im Amid I-Bereich deutlich größer und strukturierter als bei 50 °C .

In anderen Bereichen sind die Zerfallsprozesse im Vergleich zur Untersuchung der Monomere bei 50 °C verlangsamt. Die Unterschiede sind jedoch relativ gering und lassen sich in den transienten Spektren bis 20 ps nicht identifizieren. Auf eine genauere Diskussion wird daher verzichtet.

Vergleich verschiedener Temperaturen Ziel aller Experimente war es, Informationen über die Dynamik der Collagentripelhelix zu erlangen. Ein direkter Vergleich von Monomeren bei 50 °C und Tripelhelix bei 20 °C ist aber nicht möglich: In Abschnitt 6.6.3 (S. 216) wurde bereits ausführlich gezeigt, dass die spektralen Änderungen bei Erwärmung sehr komplex sind. Insofern stellt sich die Frage, ob die Unterschiede zwischen den transienten Spektren bei 20 °C und 50 °C auf die Existenz der Tripelhelix zurückzuführen sind oder nur eine Temperaturabhängigkeit derselben Prozesse reflektieren. Es wurden daher zwei Kontrollexperimente durchgeführt, um die Belastbarkeit der Daten weiter abzusichern. Zum einen wurden transiente IR-Differenzspektren des Azocollagens bei einer mittleren Temperatur von 35 °C aufgenommen und zum anderen wurde der isolierte Azoschalter ebenfalls bei einer Temperatur von 50 °C untersucht. Die Ergebnisse sind als 2d-Grafiken in Abbildung 6.44 zusammengefasst.

Beim Azocollagen erkennt man bei 20°C, vor allem bei 1630 cm⁻¹ auch nach 10 ps noch ein ausgeprägtes Bleichsignal, das erst nach über 100 ps nicht mehr aufgelöst wird. Bei 35°C ist dieses Signal zum Teil noch sichtbar, es ist jedoch weitaus kurzlebiger und weniger ausgeprägt. Bei 50°C lässt es sich allenfalls noch als kurzer Ausläufer erahnen. Neben diesem Einfluss der Temperatur auf die Kinetik kann auch die leichte Blauverschiebung der Amid I-Bande bei steigender Temperatur nachvollzogen werden.

Der Azoschalter in DMSO-*d*₆ zeigt hingegen keine derartige Abhängigkeit von der Temperatur. Mit der Erwärmung wird weder die spektrale Lage oder Form, noch die Zerfallskinetik der transienten Spezies merklich beeinflusst. Eine Temperaturabhängigkeit des Azoschalters selbst kann daher als Ursache für die Beobachtungen beim Azocollagen ausgeschlossen werden.

Der genaue Schmelzpunkt des Azocollagens ist zwar unbekannt, aber da bei 50°C die Monomere überwiegen und bei 20°C die tripelhelikale Form, sollte bei 35°C ein Gemisch aus beiden vorliegen. Die gemessenen transienten Spektren spiegeln diesen Übergangsbereich direkt wider. Das beweist noch nicht den Einfluss der Collagen-Superhelix auf die transienten Differenzspektren. Aber es kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten kleinen Unterschiede nicht durch Messartefakte oder andere äußere Einflüsse entstehen.

Globale Analyse Wie zuvor wurde eine globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten durchgeführt, von denen eine festgesetzt war ($\tau_4 = \infty$). Trotz der hier auftretenden, langsameren Prozesse ergibt die Verwendung einer zusätzlichen Zeitkonstanten keine signifikant verbesserte Modellierung der Daten.

Die Transienten in Abbildung 6.45 zeigen die Daten und die angepassten Kurven. Der Zerfall der unmittelbar erscheinenden Differenzsignale hat sich im Vergleich zur Messung bei 50°C deutlich verlangsamt. Besonders markant ist die Transiente bei 1614 cm⁻¹, die bei 10 ps einen Nulldurchgang aufweist, deutlich negativ wird und erst danach weiter abklingt. Dementsprechend liefert die Anpassungsfunktion größere Zeitkonstanten als bei der Untersuchung der Monomere: $\tau_1 = 2,8$ ps, $\tau_2 = 6,2$ ps und $\tau_3 = 51$ ps.

Die zerfallenssoziierten Spektren dieser Komponenten werden in Abbildung 6.46(a) dargestellt. Die Komponenten τ_1 und τ_2 zeigen wieder nahezu spiegelbildliche Amplituden, die weitgehend den bei 50°C gefundenen entsprechen. Die beiden Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 sind in beiden Datensätzen ebenfalls sehr ähnlich. Folglich können sie wieder den Prozessen zugeordnet werden, die mit der Relaxation nach der Photoanregung verbunden sind. Im Gegensatz dazu hat sich die Zeitkonstante τ_3 signifikant vergrößert und ihr zerfallenssoziiertes Spektrum weist eine veränderte Signatur im Amid I-Bereich auf. Bei 20°C sind eindeutig zwei negative Banden bei 1632 cm⁻¹ und 1644 cm⁻¹ zu erkennen, während bei 50°C nur ein breites, unstrukturiertes Bleichsignal auftritt. Damit beschreibt dieser Prozess das Abklingen von zusätzlich auftretenden negativen Beiträgen, die zunächst durch die zerfallenden Azoschaltersignale verdeckt werden.

Das Differenzspektrum bei langen Verzögerungszeiten wird durch $\tau_4 = \infty$ beschrieben (Abb. 6.46(b)). Es zeigt ebenfalls ein strukturiertes Amid I-Bleichen mit einem Minimum

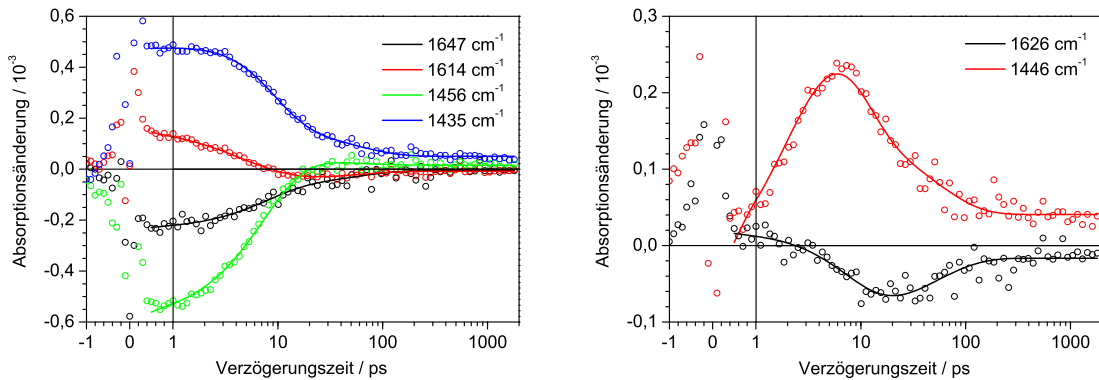


Abbildung 6.45: Transienten des Azocollagens (*trans* → *cis*, 20 °C) bei ausgewählten Wellenzahlen. Die einzelnen Signale wurden entsprechend ihrer Amplitude in zwei getrennten Diagrammen dargestellt. Rohdaten sind als Kreise und die Kurven der globalen Anpassung mit vier Zeitkonstanten als Linie dargestellt. Bei den kleinen Signalen an den Schultern der Differenzbanden ist das nicht-monoexponentielle Verhalten deutlich erkennbar.

bei 1628 cm^{-1} , einer Schulter bei 1643 cm^{-1} und einem negativen Signal bei 1671 cm^{-1} , das durch eine breite positive Bande überlagert ist. Im Bereich der Amid II'-Mode haben sich die Amplituden ebenfalls verändert: Das Maximum bei 1440 cm^{-1} ist deutlich größer und bei 1480 cm^{-1} ist eine negative Bande zu erkennen, die bei 50 °C nicht auftritt. Nimmt man an, dass diese Signatur die Rotverschiebung einer Schwingungsbande repräsentiert, dann wäre die positive Bande die Summe aus den positiven Beiträgen des auch bei 50 °C auftretenden Signals und der rotverschobenen Spezies. Zwischen 1580 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} ist die Überlagerung positiver Beiträge mit einem Bleichsignal bei 1560 cm^{-1} zu erkennen. Darauf wird später genauer eingegangen. Das Minimum bei 1603 cm^{-1} ist hingegen artifiziell: es liegt an der Grenze zweier Messbereiche, deren Amplituden an dieser Stelle einen Versatz von ca. 5×10^{-6} aufweisen.

Die Frage nach der Natur dieser langlebigen Spezies lässt sich hier zugunsten der Erwärmung nach der Photoanregung beantworten. Denn im Bereich der prominenten Amid II'-Bande ergeben sich deutliche Abweichungen zum photostationären *trans* → *cis*-Differenzspektrum, welches dort nur verschwindend geringe Amplituden aufweist. Das auf einen Temperaturunterschied von $0,025\text{ °C}$ skalierte temperaturinduzierte Differenzspektrum zeigt dagegen eine hervorragende Übereinstimmung. Dabei ist hier noch zu bedenken, dass der H/D-Austausch beim Aufheizen bei 20 °C zu erhöhter HDO-Konzentration und damit zu erhöhter Absorption im Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} sowie zum Verschwinden der Amid II-Bande bei 1556 cm^{-1} führt (vgl. Abb. 6.33(b), S. 220). Diese Effekte sollten in den zeitaufgelösten Messungen keine Rolle spielen.

Im Amid I-Bereich stimmen Form und Lage der Differenzbanden außerordentlich gut mit den Differenzspektren für deutlich größere Temperatursprünge wie z. B. von 9 °C auf 52 °C überein (vgl. Abb. 6.33(b), S. 220). Einerseits könnte das ein Hinweis darauf sein, dass Teile der Tripelhelix nach $1,8\text{ ns}$ noch eine deutlich höhere Temperatur besitzen.

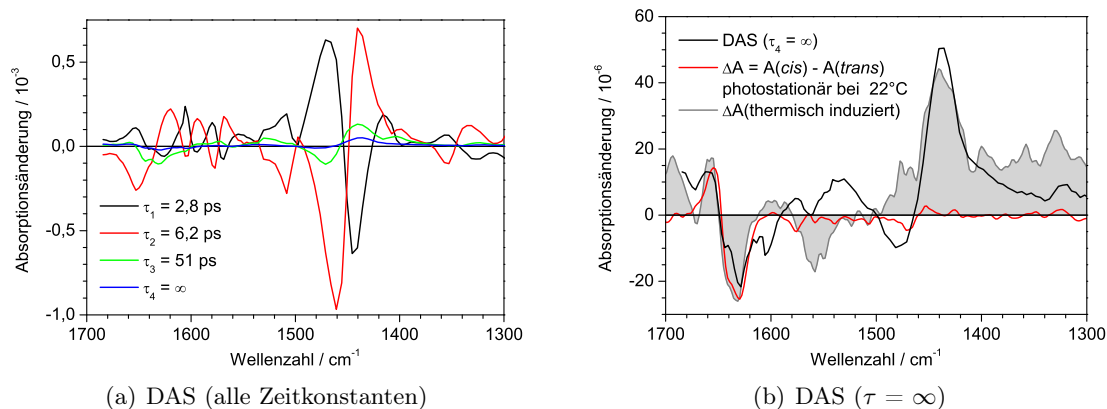


Abbildung 6.46: Zerfallasoziierte Spektren des Azocollagens (*trans* \rightarrow *cis*, 20°C) für die globale Anpassung mit vier Zeitkonstanten (a). Die konstante Komponente ($\tau = \infty$) wird in (b) dargestellt. Zum Vergleich sind das *trans* \rightarrow *cis*-Differenzspektrum der photostationären Gleichgewichte bei 20°C (Abb. 6.27(b), S. 207) und ein interpoliertes Differenzspektrum für $\Delta T = 0,025^\circ\text{C}$ bei einer Temperatur von 20°C enthalten.

Andererseits könnte die Anregung eine Störung der Struktur hervorrufen, die einer solchen Erwärmung äquivalent ist.

Einfluss der Collagen-Tripelhelix Die im Amid I-Bereich bei langen Verzögerungszeiten beobachtete Struktur der ausgebleichten Banden kann den Aminosäuren der Collagen-Peptidsequenz zugeordnet werden: 1671 cm^{-1} : Hydroxyprolin, 1644 cm^{-1} : Glycin und 1628 cm^{-1} : Prolin (vgl. Tabelle 6.7, S. 215). Damit steht fest, dass es zu einem effizienten Energietransfer zwischen dem Chromophor und der Collagen-Peptidsequenz innerhalb von weniger als 10 ps kommt. Dieser erfolgt zumindest zu einem großen Teil nicht über die kovalente Bindung an die Mercaptoproline, wie die unveränderte Kinetik im Bereich der $\gamma_w(\text{C-H}_2)$ Mode bei 1350 cm^{-1} impliziert.

Es sind verschiedene Gründe denkbar, warum diese charakteristischen Bleichsignale bei 50°C nicht auftreten. Die Monomere besitzen mehr konformationelle Freiheit, wie es in Abbildung 6.5 auf Seite 162 illustriert ist. In der gefalteten Tripelhelix sind Azoschalter und Peptidsequenz in direkter räumlicher Nähe, so dass von einem effizienten, direkten Wärmeenergietransfer zwischen angeregtem Chromophor und der Peptidsequenz auszugehen ist. Im ungefalteten Zustand ist dies nicht notwendigerweise der Fall. Außerdem ist für die Monomere mit einem wesentlich schnelleren Energietransfer an die Lösungsumgebung zu rechnen.

Die langlebigen Signale allein reichen jedoch noch nicht aus, um die Tertiärstruktur des Collagens bei 20°C in den transienten Spektren nachzuweisen. Die Amid II-Bande der Glycine stellt hingegen eine eindeutige Markerbande für die Existenz der Tripelhelix dar. Will man in den transienten Differenzspektren einen Hinweis auf das intakte Collagen finden, dann sollte in diesem Spektralbereich eine Veränderung nachzuweisen sein. Schon

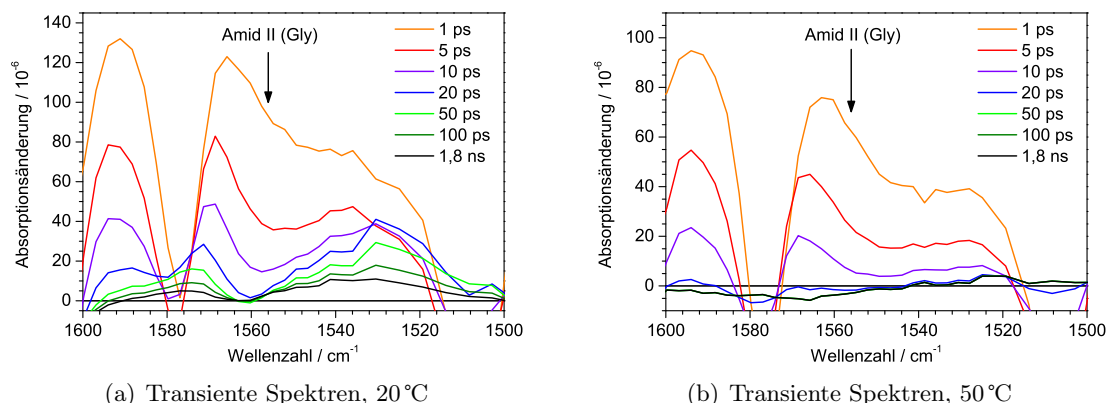


Abbildung 6.47: Vergleich der transienten Spektren bei 20°C und 50°C im Bereich der Amid II-Bande des Glycins. Diese Bande bei 1556 cm⁻¹ ist charakteristisch für die gefaltete Collagen-Tripelhelix.

bei der Präsentation des DAS der langlebigen Spezies τ_4 wurde auf das schmalbandige Signal bei 1560 cm⁻¹ hingewiesen, das nur bei 20°C auftritt. Es ist zu vermuten, dass die Anregung des Chromophors und die anschließende Energieumverteilung sich auch auf die Amid II-Mode des Glycins auswirkt. Dementsprechend ist bei 1560 cm⁻¹ das Ausbleichen dieser Bande zu erwarten.

Das Signal ist sehr klein und zudem von einer positiven Absorptionsänderung überlagert. Eine Betrachtung der transienten Spektren zeigt jedoch, dass es sich nicht um ein Artefakt handelt (Abb. 6.47). Unmittelbar nach der Anregung treten in diesem Spektralbereich eine sehr breite, positive Absorptionszunahme der Amid I-Bande und das schmalbandigere Bleichsignal der Ringmode bei 1575 cm⁻¹ auf. Beide Signale besitzen bei 50°C dieselbe Zerfallskinetik: Abgesehen von einer geringen spektralen Verschiebung lassen sich die transienten Spektren unterschiedlicher Verzögerungszeiten aufeinander skalieren. Dagegen sind bei 20°C zusätzlich ein negatives Signal bei 1560 cm⁻¹ und ein positives bei 1530 cm⁻¹ überlagert. Hier lassen sich die transienten Spektren nicht aufeinander skalieren und das kann nicht mit einer spektralen Verschiebung erklärt werden. Die zusätzlich überlagerten Differenzbanden folgen offensichtlich einer anderen Kinetik. Es ist daher anzunehmen, dass hier eine transiente Rotverschiebung der Amid II-Bande der Peptidsequenz zu beobachten ist. Diese Signatur kann wegen des H/D-Austausches nur in intakten Tripelhelices auftreten, ist also bei 50°C auch nicht zu erwarten.

Es ist sehr unwahrscheinlich, dass sich das Gleichgewicht direkt nach dem Lösen der Azocollagenprobe in EG-*d*₆:D₂O vollständig auf der Seite der Tripelhelices befindet. Haben sich drei Monomere jedoch erst später zu einer Tripelhelix assoziiert, dann sollte der H/D-Austausch bereits abgeschlossen sein und eine vergleichbare Rotverschiebung der Glycine im Amid II'-Bereich auftreten. Genau dieser Effekt ist auch beobachtet worden, die Differenzspektren der langlebigen Komponente unterscheiden sich hier deutlich für die beiden Temperaturen. Bei 20°C ist eine negative Bande bei 1480 cm⁻¹ zu erkennen, die bei 50°C nicht auftritt. Zudem ist die positive Produktbande bei 1440 cm⁻¹ bei

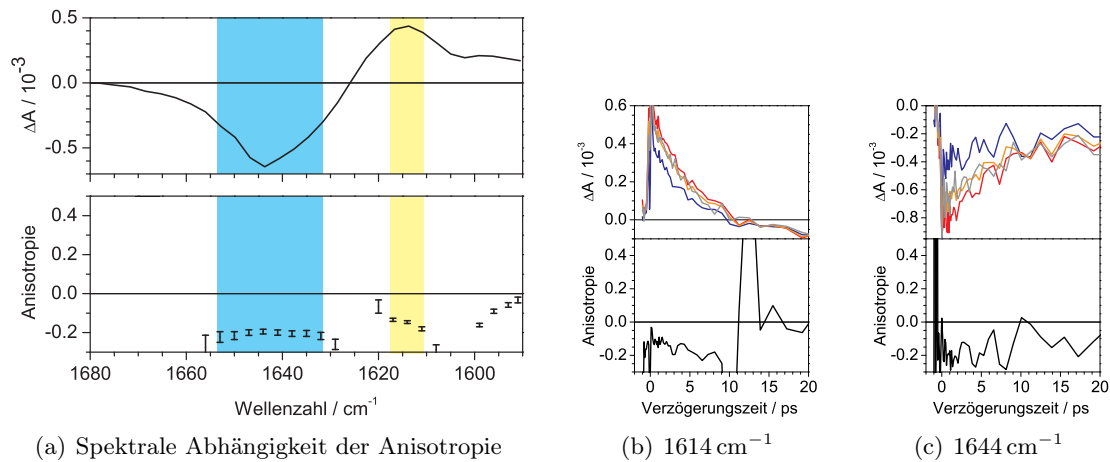


Abbildung 6.48: Azocollagen: (a) Anisotropieparameter r gemittelt im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps im Vergleich zum transienten Spektrum (magischer Winkel) nach 1 ps (b) und (c) transiente Absorptionsänderungen und Anisotropieparameter r für ausgesuchte Kanäle im Zeitbereich von -2 ps bis 20 ps. Dargestellt sind die gemessenen Absorptionsänderungen für folgende Orientierungen von Anreg- und Abtastlicht: parallel (blau), senkrecht (rot), magischer Winkel (grau) sowie die aus parallel und senkrecht berechnete Absorptionsänderung für den magischen Winkel (orange).

20 °C eine deutlich größere Amplitude. Die Annahme einer transienten Rotverschiebung der Amid II'-Bande in den Collagenen, die nach einem vollständigen H/D-Austausch korrekt gefaltet vorliegen, kann diese Befunde konsistent erklären.

In den transienten IR-Spektren, die bei Raumtemperatur aufgenommen wurden, lassen sich also Banden identifizieren, die charakteristisch für die Existenz einer intakten Collagen-Tertiärstruktur sind. Diese Merkmale treten bei einer Temperatur von 50 °C nicht auf. Außerdem sind nur bei den niedrigen Temperaturen die strukturierten Bleichsignale der Amid I-Moden der Collagenpeptide zu erkennen. Das weist darauf hin, dass es nach Anregung des Chromophors zu einer Reaktion der Collagen-Peptidsequenz kommt, also eine messbare Energieübertragung stattfindet.

In den transienten Spektren wurden jedoch keine Anhaltspunkte dafür gefunden, dass die Anregung eine Entfaltung der Tripelhelix auslöst. In Anbetracht der geringen Isomerisierungsquantenausbeute des an das Collagen gebundenen Azoschalters ist dies jedoch erwartungsgemäß.

Anisotropiemessungen

Von der Azocollagenprobe wurden ebenfalls polarisationsabhängige transiente IR-Spektren im Bereich von 1590 cm^{-1} bis 1680 cm^{-1} aufgenommen. Auf die Untersuchung in weiteren Spektralbereichen oder bei unterschiedlichen Temperaturen wurde wegen der geringen verfügbaren Probenmenge verzichtet. Die Auswertung der Anisotropie erfolgt analog zum *trans*-Isomer des Azoschalters (Abschnitt 6.5.4, S. 197). Abbildung 6.48 zeigt das im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps gemittelte Anisotropiespektrum und Transienten

Probe	Bande	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\langle r \rangle$	$\Delta\langle r \rangle$	$\langle \theta \rangle / ^\circ$	$\Delta\langle \theta \rangle / ^\circ$
Azocollagen	Amid I (-)	1644	-0,195	0,02	85	5
(<i>trans</i> → <i>cis</i>)	Amid I (+)	1614	-0,145	0,007	73	2
Azoschalter	Amid I (-)	1664	-0,156	0,003	74,3	0,6
(<i>trans</i> → <i>cis</i>)	Amid I (+)	1642	-0,091	0,006	64,8	0,8
Azoschalter	Amid I (-)	1660	-0,190	0,005	83	2
(<i>cis</i> → <i>trans</i>)	Amid I (+)	1642	0,012	0,005	54,0	0,5

Tabelle 6.8: Anisotropieparameter des Azocollagens im Vergleich mit den Werten des Azoschalters, gemittelt im Zeitbereich von 0,4 ps bis 8 ps. Angegeben sind die Werte für die Extrema der Differenzbanden, die gemäß Gl. 3.18 (S. 61) berechneten Erwartungswerte des Winkels θ und die Standardfehler der Mittelwerte.

ausgewählter Wellenzahlen. Im Spektrum sind nur die Werte dargestellt, für die $\Delta\mathbf{r} \leq 0,05$ gilt.

Die erhaltenen Daten belegen, dass die Messung der Anisotropie, trotz der notwendigen längeren Messdauer, auch für die empfindliche Azocollagenprobe möglich ist. Das erreichte Signal-zu-Rauschverhältnis ermöglicht auch hier eine quantitative Auswertung. Die auf den Maxima bzw. Minima des Amid I-Differenzsignals errechneten Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten für die Absorption des Anregungs- bzw. Abtastlichtes werden in Tabelle 6.8 zusammen mit den Werten des isolierten Azoschalters präsentiert.

Für die ausgebleichte Amid I-Bande wird mit 85° eine nahezu senkrechte Orientierung gefunden. Der Erwartungswert des Winkels $\langle \theta \rangle$ der positiven Produktbande ist dagegen mit 73° um 12° niedriger. Dieser Unterschied zwischen den Banden wurde ebenfalls bei den transienten IR-Spektren (*trans* → *cis*) des isolierten Schalters ermittelt, während die entsprechende Winkeländerung bei Anregung des *cis*-Azoschalters deutlich größer ist. Der Unterschied in den Winkeln für die Bleichsignale des isolierten Schalters (*trans* → *cis*: $74,3^\circ$) und des Azocollagens (85°) ist möglicherweise auf sterische Einschränkungen zurückzuführen. Nach der Anbindung an die Collagensequenz ist der zugängliche Konformationsraum für den Azoschalter eingeschränkt. Insofern ist es unwahrscheinlich, dass die veränderte Anisotropie in der Produktbande durch eine Änderung der Gleichgewichtskonformation infolge der Anregung verursacht wird: Trotz der sterischen Beanspruchung durch die Collagensequenz ändert sich der Erwartungswert des Winkels $\langle \theta \rangle$ um etwa den gleichen Betrag.

Es bleibt festzustellen, dass sich der Anisotropieparameter r aus den polarisationsabhängigen transienten Absorptionsänderungen zuverlässig bestimmen und quantitativ auswerten lässt. Bei komplexen Molekülen, wie dem hier untersuchten Azoschalter und Azocollagen, erfordert ihre Interpretation jedoch zusätzlich umfangreiche theoretische Modellierungen. Auf der Grundlage einfacher Strukturmodelle lassen sich die Unterschiede zwischen den hier vorgestellten Messungen nicht erklären.

6.7 Fazit

Die Idee dieses Projektes ist es, durch die Ankopplung eines photoschaltbaren Azobenzolderivates die lichtinduzierte Entfaltung einer synthetischen Collagen-Tripelhelix zu ermöglichen und diese zeitaufgelöst im IR zu beobachten. Der verwendete Schalter sowie das gekoppelte Azocollagen wurden von U. Kusebauch in der Gruppe von Prof. Luis Moroder hergestellt. Alle Einzelstränge der homotrimeren Collagen-Helix verfügen über einen seitenkettenverbrückten Azoschalter, wobei die *trans* → *cis*-Isomerisierung eines Schalters eine Störung der Struktur und so eine Entfaltungsreaktion auslösen soll.

Vor den Kurzzeitmessungen war eine umfassende Charakterisierung dieser Proben im UV/vis- und IR-Bereich notwendig. Dafür wurden die Absorptions- und die Differenzspektren der photostationären Gleichgewichtszustände, zum Teil bei unterschiedlichen Temperaturen, aufgenommen. Diese Messungen wurden von L. Lorenz durchgeführt und die zur Verfügung gestellten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit umfassend analysiert.

Für den in DMSO-*d*₆ gelösten isolierten Schalter wird eine reversible *trans/cis*-Isomerisierung zwischen den photostationären Gleichgewichtszuständen festgestellt, welche keine Temperaturabhängigkeit aufweist. Für das IR-Spektrum des Azoschalters wird eine umfassende Zuordnung der auftretenden Absorptionsbanden zu den funktionalen Gruppen vorgenommen.

Die zeitaufgelösten IR-Messungen des Azoschalters wurden polarisationsabhängig sowohl für die *trans* → *cis*- als auch für die *cis* → *trans*-Isomerisierungsrichtung aufgenommen. Die instantan auftretenden, markanten Differenzsignale können den Amid I- und Amid II-Moden der im Schalter enthaltenen Peptidbindungen sowie den Phenylmoden zugeordnet werden. Diese Signaturen zerfallen bei beiden Isomeren größtenteils auf einer Zeitskala von etwa 10 ps. Für die im magischen Winkel aufgenommenen transienten Absorptionsänderungen wird eine globale Analyse der Daten durchgeführt. Die extrahierten kinetischen Parameter beider Isomere sind nahezu identisch, was durch einen dominanten Beitrag molekularer Kühlprozesse erklärt werden kann. Die Produktspektren dieser Messungen entsprechen jedoch nicht den Differenzspektren der photostationären Gleichgewichte, sie können also nicht auf die Isomerisierung zurückgeführt werden. Das ist im Einklang mit den Ergebnissen der transienten vis-Spektren bei denen ebenfalls keine Produkt-Signatur gefunden wurde, was auf eine geringe Isomerisierungsquantenausbeute (< 10 %) für beide Isomere hindeutet.

Die zerfallenden Differenzsignale zeigen eine Anisotropie, die im Rahmen der Messgenauigkeit keine Zeitabhängigkeit aufweist. Deren Auswertung ergibt unterschiedliche Anisotropieparameter bei verschiedenen Differenzbanden aber auch zwischen den *trans* → *cis*- und den *cis* → *trans*-Spektren. Mit Hilfe theoretischer Modellierungen können diese Daten in Zukunft zu genaueren Strukturanalysen herangezogen werden.

Das Azocollagen wurde in einem (1:1)-Gemisch aus D₂O und deuteriertem Ethylenglykol (EG-*d*₆:D₂O) untersucht. Die UV/vis-Absorptionsspektren des Azocollagens zeigen keine signifikanten Veränderungen der Absorptionsbanden des Azoschalters durch die Kopplung an das Collagen. Im IR-Absorptionsspektrum können die Amid I-, Amid II-

und Amid II'-Banden des Azoschalters und der Peptidsequenz sowie viele weitere Banden zugeordnet werden. Dafür wurde unter anderem die Methode der Feinstrukturverstärkung angewendet, um die überlagerten Banden des Spektrums zu trennen. Bei den temperaturabhängigen Absolut- und Differenzspektren im UV/vis- und IR-Bereich wurden irreversible spektrale Veränderungen nach Erwärmung auf über 50 °C festgestellt. Das zeigt die Dissoziation der Collagen-Tripelhelix oberhalb des Schmelzpunktes.

Das Lösen der lyophilisiert vorgelegten Probe in EG- d_6 :D₂O führt zu einem H/D-Austausch von gebundenen Wassermolekülen und zugänglichen Protonen des Collagens. In der tripelhelikalen Struktur sind die ins Innere gerichteten Amino-Protonen der Glycine zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen gegen einen H/D-Austausch geschützt. Anhand ihrer Amid II-Bande kann daher die Existenz der Collagen-Tripelhelix und eine bei Erwärmung beschleunigte Entfaltung dieser Tertiärstruktur nachgewiesen werden.

Die Differenzspektren der photostationären Zustände ergeben kleinere Differenzsignale als beim isolierten Schalter, was auf eine verringerte Isomerisierungsquantenausbeute beim Vorliegen der tripelhelikalen Collagenstruktur hinweist. Die bei Erwärmung beobachtete Vergrößerung der Differenzsignale wird mit einer effizienteren Isomerisierung nach dem Aufschmelzen der Tripelhelix erklärt.

Transiente IR-Spektren des Azocollagens wurden bei unterschiedlichen Temperaturen ausschließlich für die *trans* → *cis*-Isomerisierungsrichtung aufgenommen. Alle instantan auftretenden Differenzsignale können auf die Schwingungsmoden des gekoppelten Azoschalters zurückgeführt werden und zerfallen größtenteils innerhalb von 10 ps, wie es auch beim isolierten Azoschalter der Fall ist. Die aus der globalen Analyse ermittelten kinetischen Parameter geben keine Hinweise auf einen signifikanten Einfluss der Peptidsequenz auf die Schalterdynamik bei 50 °C. Das wird mit der aufgeschmolzenen Tertiärstruktur in diesem Temperaturbereich erklärt.

Bei einer Temperatur von 20 °C wird hingegen das Ausbleichen von Amid I-Schwingungsbanden der Peptidsequenz bei langen Zeiten beobachtet, was eindeutig einen Energietransfer an diese Moden zeigt. Um diesen Befund zu verifizieren wurde eine Messung im Amid I-Bereich bei 35 °C durchgeführt. In den erhaltenen transienten Spektren sind die Bleichsignale des Collagens ebenfalls zu erkennen, allerdings sind diese im Vergleich zur Messung bei 20 °C bereits abgeschwächt. Das ist im Einklang mit der Annahme des Aufschmelzen eines Teils der Collagene bei einer Temperatur in der Nähe des Schmelzpunktes. Eine Kontrollmessung des isolierten Azoschalters bei einer Temperatur von 50 °C zeigte keine derartige Temperaturabhängigkeit.

Die Entfaltung der Collagensequenz infolge der lichtinduzierten Isomerisierung des gekoppelten Azoschalters ist in den transienten IR-Spektren nicht nachweisbar. Dies ist nach Analyse der Gleichgewichtsspektren auch nicht zu erwarten. Bereits das *trans* → *cis*-Differenzspektrum des isolierten Azoschalters wird aufgrund der geringen Isomerisierungsquantenausbeute nicht aufgelöst. Aufgrund der im Azocollagen weiter verringerten Quantenausbeute liegen isomerisierungsbedingte Differenzsignale unterhalb der experimentellen Auflösung.

7 Zusammenfassung

Nothing is impossible for the man who
doesn't have to do it himself.

(A. H. Weiler)

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung lichtinduzierter Strukturänderungen verschiedener photoschaltbarer Moleküle durch zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie. Hierzu war es notwendig, eine komplexe Messapparatur zu konzipieren, aufzubauen und zu optimieren. Das entwickelte Anreg-/Abtast-Experiment ermöglicht die Messung kleinster transienter Absorptionsänderungen ($\Delta A < 10^{-5}$) im Spektralbereich von 1000 cm^{-1} bis 2500 cm^{-1} mit einer Zeitauflösung von etwa 0,3 ps. Es können Anregungspulse im Bereich von 258 nm bis über 600 nm generiert werden. Über ein computergesteuertes Wellenplättchen kann die Polarisation des Anregungslichtes während der Datenaufnahme variiert werden, was eine Auswertung hinsichtlich der molekularen Anisotropie ermöglicht. Die eingesetzten Probenzellen gestatten die Untersuchung geringster Probenmengen ($V < 20\text{ }\mu\text{L}$) bei Temperaturen bis zu $50\text{ }^\circ\text{C}$.

Nitrophenylacetat (NPA) wurde hinsichtlich seiner Photodecarboxylierungsreaktion untersucht. Für alle drei Konstitutionsisomere konnte nachgewiesen werden, dass die Freisetzung von CO_2 innerhalb von 1 ns erfolgt. Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Reaktionsverläufen der drei Konstitutionen, wobei die erhaltenen Amplituden der Photoproduktspektren mit den bekannten Decarboxylierungsquantenausbeuten korrelieren. Die globale Analyse ergibt einen multiexponentiellen Aufbau des CO_2 -Signals. Im Fall von *meta*- und *para*-NPA erfolgt die Abspaltung von CO_2 über einen dominanten Zerfallskanal mit einer Zeitkonstante von $\tau \approx 200\text{ ps}$. Quantenchemische Rechnungen legen nahe, dass dieser Hauptreaktionspfad über den Triplettzustand verläuft. Bei *ortho*-NPA wird dieser Zerfallskanal effektiv gequencht, was mit einer schnellen Deaktivierung des angeregten Singulettzustandes durch einen intramolekularen Protonentransfer erklärt wird. Nach diesen Messungen steht fest, dass *meta*-Nitrophenylacetat hervorragend als *caged compound* für CO_2 geeignet ist.

Die Primärdynamik von solubilisiertem Proteorhodopsin (PR) in D_2O wurde im infraroten und sichtbaren Spektralbereich sowohl bei saurem als auch bei alkalischem pD-Wert untersucht. Dies erlaubt den direkten Vergleich der in beiden Spektralbereichen gemessenen Daten. Der primäre Protonenakzeptor Asp97 liegt dabei entweder protoniert (pD = 6,4) oder deprotoniert (pD = 9,2) vor. Die transienten vis-Absorptionsspektren ergaben, wie bei PR in H_2O , einen biexponentiellen Zerfall des angeregten Zustands und die gleichzeitige Bildung des PR_K -Photoproduktes. Die Abweichung der bei PR in D_2O ermittelten Werte von den publizierten Zeitkonstanten der H_2O -Messung wird

als kinetischer Isotopeneffekt interpretiert. Dieser variiert mit dem pD-Wert, was auf Unterschiede der Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerke in der Retinalumgebung hinweist. Die Signaturen der transienten Infrarotspektren werden den C=C- und C=N-Moden des Retinals sowie der Amid I-Mode des Proteins zugeordnet. Es konnte ebenfalls die Bildung des PR_K-Produktes nachgewiesen werden, wobei die Isomerisierungsquantenausbeute des Retinals unabhängig von der Protonierung von Asp97 ist. Die im IR bestimmten Zeitkonstanten sind dabei unabhängig vom pD-Wert und weichen von den im Sichtbaren ermittelten Werten ab. Dieser Befund wird mit dem Einfluss der molekularen Temperatur auf die transienten IR-Spektren und dem Auftreten von Kühlprozessen erklärt. Zusätzlich zum Wildtyp-Protein wurde die PR-D97N-Mutante als Modellsystem für PR im sauren pH-Bereich ebenfalls im vis- und IR-Bereich untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Ausführungen. Der geringe kinetische Isotopeneffekt weist auf ein ähnliches Wasserstoffbrückennetzwerk wie beim Wildtyp unter sauren Bedingungen hin.

Als letztes wurde ein synthetisches Modellcollagen untersucht. Die Seitenkettenverbrückung der Peptidsequenz mit einem Azobenzol-basierten, künstlichen Photoschalter sollte eine lichtinduzierte Entfaltung der Tertiärstruktur ermöglichen. Der isolierte Photoschalter und die gekoppelte Sequenz wurden zunächst unter Gleichgewichtsbedingungen sowohl im UV/vis- als auch im IR -Bereich umfangreich spektroskopisch charakterisiert. Diese Messdaten lagen zum großen Teil bereits vor und wurden in dieser Arbeit einer detaillierten Auswertung unterzogen. Für den isolierten Schalter konnte im IR-Bereich eine umfassende Bandenzuordnung erstellt werden. Dabei wird im photostationären Gleichgewicht eine reversible *trans* → *cis*-Isomerisierung festgestellt, welche keine Temperaturabhängigkeit aufweist. Darüberhinaus wurden polarisationsabhängige, transiente IR-Spektren des isolierten Azoschalters für die *trans* → *cis*- und die *cis* → *trans*-Isomerisierungsrichtung aufgenommen. Die instantan auftretenden, markanten Differenzsignale können den Amid I- und Amid II-Moden der im Schalter enthaltenen Peptidbindungen sowie den Phenylmoden zugeordnet werden. Die extrahierten kinetischen Parameter sind für beide Isomere nahezu identisch, was durch einen dominanten Beitrag molekularer Kühlprozesse erklärt werden kann. Aufgrund der geringen Isomerisierungsquantenausbeute (< 10%) können die Differenzspektren der photostationären Gleichgewichte nicht in den Produktspektren dieser Messungen reproduziert werden. Hinsichtlich der ermittelten Anisotropieparameter ergeben sich kleine Unterschiede zwischen beiden Datensätzen. Zusammen mit theoretischen Modellierungen werden diese in Zukunft genauere Aussagen über die Strukturen der Isomere erlauben. Die UV/vis-Absorptionsspektren des gekoppelten Systems zeigen, dass die Absorptionsbanden des Azoschalters durch die Kopplung an das Collagen nicht signifikant beeinflusst werden. Im IR-Absorptionsspektrum konnten wichtige Amid I-, Amid II- und Amid II'-Banden des Azoschalters und der Peptidsequenz sowie eine große Anzahl weiterer Banden zugeordnet werden. Temperaturabhängige Absolut- und Differenzspektren im UV/vis- und IR-Bereich zeigen eine irreversible thermische Denaturierung der Collagentripelhelix ab etwa 50 °C. Das verwendete, deuterierte Lösungsmittelgemisch führt zu einem H/D-Austausch. Anhand der Amid II-Bande der in der tripelhelikalen Struktur geschützten Glycine kann die Existenz der Collagenstruktur

und ihre Entfaltung nachgewiesen werden. Die Amplituden der photostationären Differenzspektren sind jedoch kleiner als beim isolierten Schalter, was auf eine verringerte Isomerisierungsquantenausbeute hinweist. Die bei Erwärmung beobachtete Vergrößerung der Differenzsignale wird mit einer effizienteren Isomerisierung nach dem Aufschmelzen der Tripelhelix erklärt. Für die *trans* → *cis*-Isomerisierungsrichtung wurden transiente IR-Spektren des Azocollagens bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Alle instantan auftretenden Differenzsignale können auf die Schwingungsmoden des Azoschalters zurückgeführt werden. Bei einer Temperatur von 50 °C lässt sich ein Einfluss der Peptidsequenz auf die transienten Spektren nicht nachweisen, was mit einer aufgeschmolzenen Tertiärstruktur im Einklang ist. Hingegen wird bei 20 °C das Ausbleichen von Amid I-Schwingungsbanden der Peptidsequenz beobachtet, was eindeutig einen Energietransfer auf diese Moden zeigt. Bei 35 °C sind die Bleichsignale des Collagens in diesem Bereich bereits deutlich abgeschwächt. Die transienten Spektren des isolierten Azoschalters besitzen keine derartige Temperaturabhängigkeit.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Michels, *Salutatory*, Science, **1**(1): 6 (1880)
- [2] F. P. Upton, *Electricity as Power*, Science, **1**(1): 5 (1880)
- [3] J. Michels, *The Edison Light*, Science, **1**(2): 18 (1880)
- [4] J. D. Badjic, V. Balzani, A. Credi, S. Silvi und J. F. Stoddart, *A Molecular Elevator*, Science, **303**(5665): 1845–1849 (2004)
- [5] M. R. Panman, P. Bodis, D. J. Shaw, B. H. Bakker, A. C. Newton, E. R. Kay, A. M. Brouwer, W. J. Buma, D. A. Leigh und S. Woutersen, *Operation Mechanism of a Molecular Machine Revealed Using Time-Resolved Vibrational Spectroscopy*, Science, **328**(5983): 1255–1258 (2010)
- [6] G. Oster und H. Wang, *Rotary protein motors*, Trends Cell Biol., **13**(3): 114–121 (2003)
- [7] M. Schliwa und G. Woehlke, *Molecular motors*, Nature, **422**(6933): 759–765 (2003)
- [8] W. R. Browne und B. L. Feringa, *Making molecular machines work*, Nat. Nano, **1**(1): 25–35 (2006)
- [9] M. Swierczek, E. Cieluch, M. Sarewicz, A. Borek, C. C. Moser, P. L. Dutton und A. Osyczka, *An Electronic Bus Bar Lies in the Core of Cytochrome bc₁*, Science, **329**(5990): 451–454 (2010)
- [10] T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. Seitz und H. E. Gaub, *Single-Molecule Optomechanical Cycle*, Science, **296**(5570): 1103–1106 (2002)
- [11] N. B. Holland, T. Hugel, G. Neuert, A. Cattani-Scholz, C. Renner, D. Oesterhelt, L. Moroder, M. Seitz und H. E. Gaub, *Single Molecule Force Spectroscopy of Azobenzene Polymers: Switching Elasticity of Single Photochromic Macromolecules*, Macromolecules, **36**(6): 2015–2023 (2003)
- [12] T. Muraoka, K. Kinbara und T. Aida, *Mechanical twisting of a guest by a photore sponsive host*, Nature, **440**(7083): 512–515 (2006)
- [13] G. Neuert, T. Hugel, R. R. Netz und H. E. Gaub, *Elasticity of Poly(azobenzene-peptides)*, Macromolecules, **39**(2): 789–797 (2006)

- [14] M. Mickler und T. Hugel, *Molekulare Motoren und künstliche Nanomaschinen. Energiewandlung in Polymeren*, Phys. unserer Zeit, **39**(1): 14–20 (2008)
- [15] H. Kang, H. Liu, J. A. Phillips, Z. Cao, Y. Kim, Y. Chen, Z. Yang, J. Li und W. Tan, *Single-DNA Molecule Nanomotor Regulated by Photons*, Nano Lett., **9**(7): 2690–2696 (2009)
- [16] L. Lapinski, M. J. Nowak, J. Nowacki, M. F. Rode und A. L. Sobolewski, *A Bistable Molecular Switch Driven by Photoinduced Hydrogen-Atom Transfer*, ChemPhysChem, **10**(13): 2290–2295 (2009)
- [17] S. Ogasawara und M. Maeda, *Reversible Photoswitching of a G-Quadruplex*, Angew. Chem., **121**(36): 6799–6802 (2009)
- [18] L. Guerrero, O. S. Smart, G. A. Woolley und R. K. Allemann, *Photocontrol of DNA Binding Specificity of a Miniature Engrailed Homeodomain*, J. Am. Chem. Soc., **127**(44): 15624–15629 (2005)
- [19] G. Mayer und A. Heckel, *Biologically Active Molecules with a „Light Switch“*, Angew. Chem., Int. Ed., **45**(30): 4900–4921 (2006)
- [20] J. R. Kumita, D. G. Flint, O. S. Smart und G. Woolley, *Photo-control of peptide helix content by an azobenzene cross-linker: steric interactions with underlying residues are not critical*, Protein Eng., **15**(7): 561–569 (2002)
- [21] J. Helbing, H. Bregy, J. Bredenbeck, R. Pfister, P. Hamm, R. Huber, J. Wachtveitl, L. De Vico und M. Olivucci, *A Fast Photoswitch for Minimally Perturbed Peptides: Investigation of the trans \rightarrow cis Photoisomerization of N-Methylthioacetamide*, J. Am. Chem. Soc., **126**(28): 8823–8834 (2004)
- [22] J. Bredenbeck, J. Helbing, J. R. Kumita, G. A. Woolley und P. Hamm, *α -Helix formation in a photoswitchable peptide tracked from picoseconds to microseconds by time-resolved IR spectroscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**(7): 2379–2384 (2005)
- [23] C. Renner, U. Kusebauch, M. Löweneck, A. Milbradt und L. Moroder, *Azobenzene as photoresponsive conformational switch in cyclic peptides*, J. Peptide Res., **65**(1): 4–14 (2005)
- [24] C. Renner und L. Moroder, *Azobenzene as Conformational Switch in Model Peptides*, ChemBioChem, **7**(6): 868–878 (2006)
- [25] D. Sampedro, A. Migani, A. Pepi, E. Busi, R. Basosi, L. Latterini, F. Elisei, S. Fusi, F. Ponticelli, V. Zanirato und M. Olivucci, *Design and Photochemical Characterization of a Biomimetic Light-Driven Z/E Switcher*, J. Am. Chem. Soc., **126**(30): 9349–9359 (2004)

- [26] T. Cordes, D. Weinrich, S. Kempa, K. Riesselmann, S. Herre, C. Hoppmann, K. Rück-Braun und W. Zinth, *Hemithioindigo-based photoswitches as ultrafast light trigger in chromopeptides*, Chem. Phys. Lett., **428**(1-3): 167–173 (2006)
- [27] K. G. Yager und C. J. Barrett, *Novel photo-switching using azobenzene functional materials*, J. Photochem. Photobiol., A, **182**(3): 250–261 (2006)
- [28] H. Bouas-Laurent und H. Dürr, *Organic photochromism*, Pure Appl. Chem., **73**(4): 639–665 (2001)
- [29] H. Dürr und H. Bouas-Laurent, Herausgeber, *Photochromism: Molecules and Systems*, Elsevier Science, Amsterdam (2003), ISBN: 978-0-444-51322-9
- [30] R. H. El Halabieh, O. Mermut und C. J. Barrett, *Using light to control physical properties of polymers and surfaces with azobenzene chromophores*, Pure Appl. Chem., **76**(7–8): 1445–1465 (2004)
- [31] P. Altoe, F. Bernardi, I. Conti, M. Garavelli, F. Negri und G. Orlandi, *Light driven molecular switches: exploring and tuning their photophysical and photochemical properties*, Theor. Chem. Acc., **117**(5): 1041–1059 (2007)
- [32] T. Ikeda und O. Tsutsumi, *Optical Switching and Image Storage by Means of Azobenzene Liquid-Crystal Films*, Science, **268**(5219): 1873–1875 (1995)
- [33] D. A. Parthenopoulos und P. M. Rentzepis, *Three-Dimensional Optical Storage Memory*, Science, **245**(4920): 843–845 (1989)
- [34] G. Berkovic, V. Krongauz und V. Weiss, *Spiropyrans and Spirooxazines for Memories and Switches*, Chem. Rev., **100**(5): 1741–1754 (2000)
- [35] N. Hampp, *Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories*, Chem. Rev., **100**(5): 1755–1776 (2000)
- [36] M. Irie, *Diarylethenes for Memories and Switches*, Chem. Rev., **100**(5): 1685–1716 (2000)
- [37] S. Kawata und Y. Kawata, *Three-Dimensional Optical Data Storage Using Photochromic Materials*, Chem. Rev., **100**(5): 1777–1788 (2000)
- [38] Y. Yokoyama, *Fulgides for Memories and Switches*, Chem. Rev., **100**(5): 1717–1740 (2000)
- [39] X. Chen, Y. Zhang, B. Liu, J. Zhang, H. Wang, W. Zhang, Q. Chen, S. Pei und Z. Jiang, *Novel photoactive hyperbranched poly(aryl ether)s containing azobenzene chromophores for optical storage.*, J. Mater. Chem., **18**(41): 5019–5026 (2008)
- [40] J. Chung, S.-J. Yoon, S.-J. Lim, B.-K. An und S. Park, *Dual-Mode Switching in Highly Fluorescent Organogels: Binary Logic Gates with Optical/Thermal Inputs*, Angew. Chem., **121**(38): 7164–7168 (2009)

- [41] J. A. Delaire und K. Nakatani, *Linear and Nonlinear Optical Properties of Photochromic Molecules and Materials*, Chem. Rev., **100**(5): 1817–1846 (2000)
- [42] C. Cojocariu und P. Rochon, *Light-induced motions in azobenzene containing polymers*, Pure Appl. Chem., **76**(7–8): 1479–1497 (2004)
- [43] X. Chen, B. Liu, H. Zhang, S. Guan, J. Zhang, W. Zhang, Q. Chen, Z. Jiang und M. D. Guiver, *Fabrication of Fluorescent Holographic Micropatterns Based on Azobenzene-Containing Host–Guest Complexes*, Langmuir, **25**(18): 10444–10446 (2009)
- [44] S. Wagner, F. Leyssner, C. Kordel, S. Zarwell, R. Schmidt, M. Weinelt, K. Ruck-Braun, M. Wolf und P. Tegeder, *Reversible photoisomerization of an azobenzene-functionalized self-assembled monolayer probed by sum-frequency generation vibrational spectroscopy*, Phys. Chem. Chem. Phys., **11**(29): 6242–6248 (2009)
- [45] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpeitz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld und M. Sauer, *Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes*, Angew. Chem., Int. Ed., **47**(33): 6172–6176 (2008)
- [46] M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee und M. Sauer, *Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores*, Angew. Chem., Int. Ed., **48**(37): 6903–6908 (2009)
- [47] S. Krimm und J. Bandekar, *Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins*, Adv. Prot. Chem., **38**: 181–367 (1986)
- [48] A. Barth und C. Zscherp, *What vibrations tell about proteins*, Q. Rev. Biophys., **35**(04): 369–430 (2002)
- [49] A. Barth, *Infrared spectroscopy of proteins*, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg., **1767**(9): 1073–1101 (2007)
- [50] S. W. Englander, N. W. Downer und H. Teitelbaum, *Hydrogen Exchange*, Annu. Rev. Biochem., **41**(1): 903–924 (1972)
- [51] M. Eriksson, T. Härd und L. Nilsson, *On the pH dependence of amide proton exchange rates in proteins*, Biophys. J., **69**(2): 329–339 (1995)
- [52] D. L. Smith, Y. Deng und Z. Zhang, *Probing the Non-covalent Structure of Proteins by Amide Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry*, J. Mass Spectrom., **32**(2): 135–146 (1997)
- [53] R. S. Molday, S. W. Englander und R. G. Kallen, *Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange*, Biochemistry, **11**(2): 150–158 (1972)

-
- [54] Y. Bai, J. S. Milne, L. Mayne und S. W. Englander, *Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange*, *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **17**(1): 75–86 (1993)
- [55] S. W. Englander und N. R. Kallenbach, *Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids*, *Q. Rev. Biophys.*, **4**: 521–655 (1984)
- [56] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux und J. M. Ruyschaert, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange.*, *Subcell. Biochem.*, **23**: 363–403 (1994)
- [57] J. Backmann, C. Schultz, H. Fabian, U. Hahn, W. Saenger und D. Naumann, *Thermally induced hydrogen exchange processes in small proteins as seen by FTIR spectroscopy*, *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **24**(3): 379–387 (1996)
- [58] T. M. Raschke und S. Marqusee, *Hydrogen exchange studies of protein structure*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**: 80–86 (1998)
- [59] C. Krejtschi, *Zeitaufgelöste Infrarot-Messungen zur Untersuchung der Konformationsdynamik von Peptiden mit Laserinduziertem Temperatursprung*, Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2007)
- [60] M. Kasha, *Characterization of electronic transitions in complex molecules*, *Discuss. Faraday Soc.*, **9**: 14–19 (1950)
- [61] S. E. Braslavsky, *Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006)*, *Pure Appl. Chem.*, 293–465 (2007)
- [62] P. Hamm, S. M. Ohline und W. Zinth, *Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene measured by femtosecond infrared spectroscopy*, *J. Chem. Phys.*, **106**(2): 519–529 (1997)
- [63] P. Hamm, M. Zurek, T. Röschinger, H. Patzelt, D. Oesterhelt und W. Zinth, *Subpicosecond infrared spectroscopy on the photoisomerisation of the protonated Schiff base of all-trans retinal*, *Chem. Phys. Lett.*, **268**(1-2): 180–186 (1997)
- [64] A. J. DeMaria, D. A. Stetser und J. Glenn, W. H., *Ultrashort Light Pulses*, *Science*, **156**(3782): 1557–1568 (1967)
- [65] P. M. W. French, *The generation of ultrashort laser pulses*, *Rep. Prog. Phys.*, **58**(2): 169–262 (1995)
- [66] A. M. Weiner, *Ultrafast Optics*, Wiley (2009)
- [67] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Academic Press, 2nd edition (2003)

- [68] W. Demtröder, *Laserspektroskopie : Grundlagen und Techniken, 5., erweiterte u. neubearbeitete Auflage*, Springer Verlag (2007)
- [69] Y. R. Shen, *Principles of Nonlinear Optics*, Wiley VCH Verlagsgesellschaft (1984)
- [70] P. Maine, D. Strickland, P. Bado, M. Pessot und G. Mourou, *Generation Of Ultrahigh Peak Power Pulses By Chirped Pulse Amplification*, IEEE J. Quantum. Electron., **24**(2): 398–403 (1988)
- [71] D. Meschede, *Optik, Licht, Laser*, Vieweg + Teubner (2008)
- [72] SNLO nonlinear optics code available from A. V. Smith, AS-Photonics, Albuquerque, NM
- [73] J. E. Midwinter und J. Warner, *The effects of phase matching method and of uniaxial crystal symmetry on the polar distribution of second-order non-linear optical polarization*, Br. J. Appl. Phys., **16**(8): 1135–1142 (1965)
- [74] J. Armstrong, N. Boembergen, J. Ducuing und P. Perhan, *Interactions between light waves in a nonlinear dielectric.*, Phys. Rev., **127**: 1918–1939 (1962)
- [75] G. Magel, M. Fejer und R. Byer, *Quasi-phase-matched second harmonic generation of blue light in periodically poled LiNbO₃*, Appl. Phys. Lett., **56**: 108–110 (1990)
- [76] M. K. Reed, M. K. Steinershepard, M. S. Armas und D. K. Negus, *Microjoule-Energy Ultrafast Optical Parametric-Amplifiers*, J. Opt. Soc. Am. B, **12**(11): 2229–2236 (1995)
- [77] G. Cerullo, M. Nisoli und S. De Silvestri, *Generation of 11 fs pulses tunable across the visible by optical parametric amplification*, Appl. Phys. Lett., **71**(25): 3616–3618 (1997)
- [78] T. Wilhelm, J. Piel und 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)
- [79] G. Steinmeyer, D. H. Sutter, L. Gallmann, N. Matuschek und U. Keller, *Frontiers in Ultrashort Pulse Generation: Pushing the Limits in Linear and Nonlinear Optics*, Science, **286**(5444): 1507–1512 (1999)
- [80] J. Piel, M. Beutter und E. Riedle, *20–50-fs pulses tunable across the near infrared from a blue-pumped noncollinear parametric amplifier*, Opt. Lett., **25**(3): 180–182 (2000)
- [81] E. Riedle, M. Beutter, S. Lochbrunner, J. Piel, S. Schenkl, S. Spörlein und W. Zinth, *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **71**(3): 457–465 (2000)

-
- [82] R. Huber, H. Satzger, W. Zinth und J. Wachtveitl, *Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF_2* , Opt. Commun., **194**(4-6): 443–448 (2001)
- [83] K. Osvay, G. Kurdi, J. Klebniczki, M. Csatari, I. Ross, E. Divall, C. Hooker und A. Langley, *Broadband amplification of ultraviolet laser pulses*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **74**(0): s163–s169 (2002)
- [84] G. Cerullo und S. D. Silvestri, *Ultrafast optical parametric amplifiers*, Rev. Sci. Instrum., **74**(1): 1–18 (2003)
- [85] H. Liu, W. Zhao, Y. Yang, H. Wang, Y. Wang und G. Chen, *Matching of both group-velocity and pulse-front for ultrabroadband three-wave-mixing with noncollinear angularly dispersed geometry*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **82**(4): 585–594 (2006)
- [86] R. R. Alfano und S. L. Shapiro, *Observation of Self-Phase Modulation and Small-Scale Filaments in Crystals and Glasses*, Phys. Rev. Lett., **24**(11): 592–594 (1970)
- [87] R. R. Alfano und S. L. Shapiro, *Emission in the Region 4000 to 7000 Å Via Four-Photon Coupling in Glass*, Phys. Rev. Lett., **24**(11): 584– (1970)
- [88] R. R. Alfano, Herausgeber, *The supercontinuum laser source: Fundamentals with Updated References*, Springer Science+Business Media, Inc., New York, second Auflage (2006)
- [89] A. L. Gaeta, *Catastrophic Collapse of Ultrashort Pulses*, Phys. Rev. Lett., **84**(16): 3582–3585 (2000)
- [90] M. Kolesik, G. Katona, J. Moloney und E. Wright, *Theory and simulation of supercontinuum generation in transparent bulk media*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **77**(2-3): 185–195 (2003)
- [91] M. Kolesik, G. Katona, J. V. Moloney und E. M. Wright, *Physical factors limiting the spectral extent and band gap dependence of supercontinuum generation*, Phys. Rev. Lett., **91**(4): 043905 (2003)
- [92] N. Aközbek, A. Becker und S. L. Chin, *Propagation and filamentation of femtosecond laser pulses in optical media*, Laser Phys., **15**(4): 607–615 (2005)
- [93] R. L. Fork, C. V. Shank, C. Hirlimann, R. Yen und W. J. Tomlinson, *Femtosecond white-light continuum pulses*, Opt. Lett., **8**(1): 1–3 (1983)
- [94] A. Brodeur, F. A. Ilkov und S. L. Chin, *Beam filamentation and the white light continuum divergence*, Opt. Commun., **129**(3-4): 193–198 (1996)
- [95] A. Brodeur und S. Chin, *Ultrafast white-light continuum generation and self-focusing in transparent condensed media*, J. Opt. Soc. Am. B, **16**(4): 637–650 (1999)

- [96] N. Aközbek, M. Scalora, C. M. Bowden und S. L. Chin, *White-light continuum generation and filamentation during the propagation of ultra-short laser pulses in air*, Opt. Commun., **191**(3-6): 353–362 (2001)
- [97] A. Dharmadhikari, F. Rajgara und D. Mathur, *Systematic study of highly efficient white light generation in transparent materials using intense femtosecond laser pulses*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **80**(1): 61–66 (2005)
- [98] A. Couairon und A. Mysyrowicz, *Femtosecond filamentation in transparent media*, Phys. Rep., **441**(2-4): 47–189 (2007)
- [99] Y. Chen, F. Theberge, C. Marceau, H. Xu, N. Aközbek, O. Kosareva und S. Chin, *Observation of filamentation-induced continuous self-frequency down shift in air*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **91**(2): 219–222 (2008)
- [100] L. Berge, S. Skupin, R. Nuter, J. Kasparian und J.-P. Wolf, *Ultrashort filaments of light in weakly ionized, optically transparent media*, Rep. Prog. Phys., **70**(10): 1633–1713 (2007)
- [101] A. L. Gaeta, *Collapsing Light Really Shines*, Science, **301**(5629): 54–55 (2003)
- [102] J. Kasparian, M. Rodriguez, G. Mejean, J. Yu, E. Salmon, H. Wille, R. Bourayou, S. Frey, Y.-B. Andre, A. Mysyrowicz, R. Sauerbrey, J.-P. Wolf und L. Woste, *White-Light Filaments for Atmospheric Analysis*, Science, **301**(5629): 61–64 (2003)
- [103] A. Brodeur und S. L. Chin, *Band-Gap Dependence of the Ultrafast White-Light Continuum*, Phys. Rev. Lett., **80**(20): 4406–4409 (1998)
- [104] A. Srivastava und D. Goswami, *Control of supercontinuum generation with polarization of incident laser pulses*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **77**(2-3): 325–328 (2003)
- [105] J. Tate und D. Schumacher, *A novel study of supercontinuum generation*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **74**(0): s57–s62 (2002)
- [106] D. Zeidler, T. Witte, D. Proch und M. Motzkus, *Amplification of tailored white-light continuum*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **74**(0): s51–s56 (2002)
- [107] M. Bradler, P. Baum und E. Riedle, *Femtosecond continuum generation in bulk laser host materials with sub- μ J pump pulses*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **97**(3): 561–574 (2009)
- [108] E. B. Treacy, *Optical Pulse Compression With Diffraction Gratings*, IEEE J. Quantum. Electron., **5**(9): 454–458 (1969)
- [109] K. Tamura, H. Haus und E. Ippen, *Self-starting additive pulse mode-locked erbium fibre ring laser*, Electron. Lett, **28**(24): 2226–2228 (1992)

-
- [110] S. Backus, C. G. Durfee III, M. M. Murnane und H. C. Kapteyn, *High power ultrafast lasers*, Rev. Sci. Instrum., **69**(3): 1207–1223 (1998)
- [111] R. L. Fork, O. E. Martinez und J. P. Gordon, *Negative dispersion using pairs of prisms*, Opt. Lett., **9**(5): 150–152 (1984)
- [112] J. D. Kafka und T. Baer, *Prism-pair dispersive delay lines in optical pulse compression*, Opt. Lett., **12**(6): 401–403 (1987)
- [113] J. Zheng und H. Zacharias, *Design considerations for a compact grism stretcher for non-collinear optical parametric chirped-pulse amplification*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **96**(2): 445–452 (2009)
- [114] P. Baum, S. Lochbrunner, L. Gallmann, G. Steinmeyer, U. Keller und E. Riedle, *Real-time characterization and optimal phase control of tunable visible pulses with a flexible compressor*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **74**(0): s219–s224 (2002)
- [115] I. Kozma, P. Baum, S. Lochbrunner und E. Riedle, *Widely tunable sub-30 fs ultraviolet pulses by chirped sum frequency mixing*, Opt. Express, **11**(23): 3110–3115 (2003)
- [116] B. Akhremitchev, C. Wang und G. C. Walker, *A femtosecond absorption spectrometer tunable from 50 000 to 800 cm^{-1} : Nonlinear optics and pump/probe geometries*, Rev. Sci. Instrum., **67**(11): 3799–3805 (1996)
- [117] G. M. Gale, G. Gallot, F. Hache und R. Sander, *Generation of intense highly coherent femtosecond pulses in the mid infrared*, Opt. Lett., **22**(16): 1253–1255 (1997)
- [118] J. Song, J. F. Xia, Z. Zhang und D. Strickland, *Mid-infrared pulses generated from the mixing output of an amplified, dual-wavelength Ti:sapphire system*, Opt. Lett., **27**(3): 200–202 (2002)
- [119] P. Hamm, C. Lauterwasser und W. Zinth, *Generation of tunable subpicosecond light pulses in the midinfrared between 4.5 and 11.5 μm* , Opt. Lett., **18**(22): 1943–1945 (1993)
- [120] S. M. Foreman, D. J. Jones und J. Ye, *Flexible and rapidly configurable femtosecond pulse generation in the mid-IR*, Opt. Lett., **28**(5): 370–372 (2003)
- [121] F. Seifert, V. Petrov und M. Woerner, *Solid-state laser system for the generation of midinfrared femtosecond pulses tunable from 3.3 to 10 μm* , Opt. Lett., **19**(23): 2009–2011 (1994)
- [122] B. Golubovic und M. K. Reed, *All-solid-state generation of 100-kHz tunable mid-infrared 50-fs pulses in type I and type II AgGaS_2* , Opt. Lett., **23**(22): 1760–1762 (1998)

- [123] R. A. Kaindl, M. Wurm, K. Reimann, P. Hamm, A. M. Weiner und M. Woerner, *Generation, shaping, and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20 μm* , J. Opt. Soc. Am. B, **17**(12): 2086–2094 (2000)
- [124] C. Ventalon, J. M. Fraser, J.-P. Likforman, D. M. Villeneuve, P. B. Corkum und M. Joffe, *Generation and complete characterization of intense mid-infrared ultrashort pulses*, J. Opt. Soc. Am. B, **23**(2): 332–340 (2006)
- [125] F. O. Koller, K. Haiser, M. Huber, T. E. Schrader, N. Regner, W. J. Schreier und W. Zinth, *Generation of narrowband subpicosecond mid-infrared pulses via difference frequency mixing of chirped near-infrared pulses*, Opt. Lett., **32**(22): 3339–3341 (2007)
- [126] C. Erny, L. Gallmann und U. Keller, *High-repetition-rate femtosecond optical parametric chirped-pulse amplifier in the mid-infrared*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **96**(2): 257–269 (2009)
- [127] P. Hamm, R. A. Kaindl und J. Stenger, *Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources*, Opt. Lett., **25**(24): 1798–1800 (2000)
- [128] H. Staudt, *Femtosekunden-Infrarotspektroskopie an organischen Pigmenten*, Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt (2007)
- [129] J. Bredenbeck und P. Hamm, *Versatile small volume closed-cycle flow cell system for transient spectroscopy at high repetition rates*, Rev. Sci. Instrum., **74**(6): 3188–3189 (2003)
- [130] J. Bredenbeck, *Transient 2D-IR Spectroscopy – Towards Ultrafast Structural Dynamics of Peptides and Proteins*, Doktorarbeit, Universität Zürich (2005)
- [131] S. Spörlein, *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (2001)
- [132] I. Lutz, *Vielkanal-Femtosekunden-Spektroskopie der Primärreaktionen von archaeobakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (2001)
- [133] I. Hartl, *Das Programm URMEI zur Anpassung zeitaufgelöster Messungen in der Ultrakurzzeitspektroskopie.*, Praktikumsarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München (1993)
- [134] W. Holzappel, U. Finkle, W. Kaiser, D. Oesterhelt, H. Scheer, H. U. Stolz und W. Zinth, *Initial electron-transfer in the reaction center from Rhodobacter sphaeroides*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**(13): 5168–5172 (1990)
- [135] G. R. Fleming, *Chemical applications of ultrafast spectroscopy*, Kapitel 6, Oxford University Press, New York (1986)

-
- [136] H.-S. Tan, I. R. Piletic und M. D. Fayer, *Polarization selective spectroscopy experiments: methodology and pitfalls*, J. Opt. Soc. Am. B, **22**(9): 2009–2017 (2005)
- [137] K. Wynne, G. Haran, G. Reid, C. Moser, P. Dutton und R. Hochstrasser, *Femtosecond infrared spectroscopy of low-lying excited states in reaction centers of rhodobacter sphaeroides.*, J. Phys. Chem., **100**: 5140–5148 (1996)
- [138] P. Hamm, *Coherent effects in femtosecond infrared spectroscopy*, Chem. Phys., **200**(3): 415–429 (1995)
- [139] K. Wynne und R. M. Hochstrasser, *The theory of ultrafast vibrational spectroscopy*, Chem. Phys., **193**(3): 211–236 (1995)
- [140] M. Joffre, D. Hulin, A. Migus, A. Antonetti, C. B. a la Guillaume, N. Peyghambarian, M. Lindberg und S. W. Koch, *Coherent effects in pump-probe spectroscopy of excitons*, Opt. Lett., **13**(4): 276–278 (1988)
- [141] P. Nuernberger, K. F. Lee, A. Bonvalet, T. Polack, M. H. Vos, A. Alexandrou und M. Joffre, *Suppression of perturbed free-induction decay and noise in experimental ultrafast pump-probe data*, Opt. Lett., **34**(20): 3226–3228 (2009)
- [142] H. Graener, T. Patzlaff und G. Seifert, *Unusual reshaping of ultrashort mid-IR pulses in atmospheric carbon dioxide*, Opt. Commun., **214**(1-6): 297–304 (2002)
- [143] M. Woerner, A. Seilmeier und W. Kaiser, *Reshaping of infrared picosecond pulses after passage through atmospheric CO₂*, Opt. Lett., **14**(12): 636–638 (1989)
- [144] H.-J. Hartmann und A. Laubereau, *Coherent pulse propagation in the infrared on the picosecond time scale*, Opt. Commun., **47**(2): 117–122 (1983)
- [145] H.-J. Hartmann und A. Laubereau, *Transient infrared spectroscopy on the picosecond time scale by coherent pulse propagation*, J. Chem. Phys., **80**(10): 4663–4670 (1984)
- [146] E. Baigar, *Femtosekundenspektroskopie an Farbstofflösungen: Dynamischer Stokes Shift, Elektrontransfer und Wellenpaketbewegungen.*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (2003)
- [147] S. A. Kovalenko, A. L. Dobryakov, J. Ruthmann und N. P. Ernsting, *Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing*, Phys. Rev. A, **59**(3): 2369–2384 (1999)
- [148] K. Ekvall, P. van der Meulen, C. Dhollande, L. E. Berg, S. Pommeret, R. Naskrecki und J. C. Mialocq, *Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy*, J. Appl. Phys., **87**(5): 2340–2352 (2000)

- [149] M. Lorenc, M. Ziolk, R. Naskrecki, J. Karolczak, J. Kubicki und A. Maciejewski, *Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **74**(1): 19–27 (2002)
- [150] A. L. Dobryakov, S. A. Kovalenko und N. P. Ernsting, *Electronic and vibrational coherence effects in broadband transient absorption spectroscopy with chirped supercontinuum probing*, J. Chem. Phys., **119**(2): 988–1002 (2003)
- [151] A. L. Dobryakov, S. A. Kovalenko und N. P. Ernsting, *Coherent and sequential contributions to femtosecond transient absorption spectra of a rhodamine dye in solution.*, J. Chem. Phys., **123**(4): 044502 (2005)
- [152] A. Dobryakov, J. Pérez Lustres, S. Kovalenko und N. Ernsting, *Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications*, Chem. Phys., **347**(1-3): 127–138 (2008)
- [153] I. Z. Kozma, P. Baum, U. Schmidhammer, S. Lochbrunner und E. Riedle, *Compact autocorrelator for the online measurement of tunable 10 femtosecond pulses*, Rev. Sci. Instrum., **75**(7): 2323–2327 (2004)
- [154] W. H. Knox, *Dispersion measurements for femtosecond-pulse generation and applications*, Appl. Phys. B: Lasers Opt., **58**(3): 225–235 (1994)
- [155] D. J. Kane und R. Trebino, *Single-shot measurement of the intensity and phase of an arbitrary ultrashort pulse by using frequency-resolved optical gating*, Opt. Lett., **18**(10): 823–825 (1993)
- [156] R. Trebino, K. W. DeLong, D. N. Fittinghoff, J. N. Sweetser, M. A. Krumbugel, B. A. Richman und D. J. Kane, *Measuring ultrashort laser pulses in the time-frequency domain using frequency-resolved optical gating*, Rev. Sci. Instrum., **68**(9): 3277–3295 (1997)
- [157] C. Iaconis und I. Walmsley, *Spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction of ultrashort optical pulses*, Opt. Lett., **23**(10): 792–794 (1998)
- [158] L. Gallmann, G. Steinmeyer, D. H. Sutter, T. Rupp, C. Iaconis, I. A. Walmsley und U. Keller, *Spatially resolved amplitude and phase characterization of femtosecond optical pulses*, Opt. Lett., **26**(2): 96–98 (2001)
- [159] P. Baum, S. Lochbrunner und E. Riedle, *Zero-additional-phase SPIDER: full characterization of visible and sub-20-fs ultraviolet pulses*, Opt. Lett., **29**(2): 210–212 (2004)
- [160] K. J. Kubarych, M. Joffre, A. Moore, N. Belabas und D. M. Jonas, *Mid-infrared electric field characterization using a visible charge-coupled-device-based spectrometer*, Opt. Lett., **30**(10): 1228–1230 (2005)

- [161] C. Ventalon, J. M. Fraser und M. Joffre, *Time-domain interferometry for direct electric field reconstruction of mid-infrared femtosecond pulses*, Opt. Lett., **28**(19): 1826–1828 (2003)
- [162] C. G. Bochet, *Photolabile protecting groups and linkers.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, **2**: 125–142 (2002)
- [163] V. N. R. Pillai, *Photoremovable protecting groups in organic synthesis*, Synthesis, 1–26 (1980)
- [164] T. W. Greene und P. G. M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, New York (1999)
- [165] J. H. Kaplan, B. Forbush und J. F. Hoffman, *Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog: utilization by the sodium:potassium pump of human red blood cell ghosts*, Biochemistry, **17**(10): 1929–1935 (1978)
- [166] S. R. Adams und R. Y. Tsien, *Controlling Cell Chemistry with Caged Compounds*, Annu. Rev. Physiol., **55**(1): 755–784 (1993)
- [167] J. A. McCray und D. R. Trentham, *Properties and Uses of Photoreactive Caged Compounds*, Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **18**(1): 239–270 (1989)
- [168] A. P. Pelliccioli und J. Wirz, *Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications*, Photochem. Photobiol. Sci., **1**(7): 441–458 (2002)
- [169] J. D. Margerum, *Transient Photodecarboxylation Intermediates*, J. Am. Chem. Soc., **87**(16): 3772–3773 (1965)
- [170] J. D. Margerum und C. T. Petrusis, *Photodecarboxylation of nitrophenylacetate ions*, J. Am. Chem. Soc., **91**(10): 2467–2472 (1969)
- [171] M. A. El-Sayed, *Spin-Orbit Coupling and the Radiationless Processes in Nitrogen Heterocyclics*, J. Chem. Phys., **38**(12): 2834–2838 (1963)
- [172] A. Sytnik und M. Kasha, *Spectroscopic criteria for wavelength shifting, fast, and red-infrared scintillators*, Radiat. Phys. Chem., **41**(1-2): 331–349 (1993)
- [173] R. Hurley und A. C. Testa, *Triplet-state yield of aromatic nitro compounds*, J. Am. Chem. Soc., **90**(8): 1949–1952 (1968)
- [174] M. Takezaki, N. Hirota und M. Terazima, *Nonradiative Relaxation Processes and Electronically Excited States of Nitrobenzene Studied by Picosecond Time-Resolved Transient Grating Method*, J. Phys. Chem. A, **101**(19): 3443–3448 (1997)
- [175] M. Takezaki, N. Hirota und M. Terazima, *Relaxation of nitrobenzene from the excited singlet state*, J. Chem. Phys., **108**(11): 4685–4686 (1998)

- [176] R. W. Yip, D. K. Sharma, R. Giasson und D. Gravel, *Picosecond excited-state absorption of alkyl nitrobenzenes in solution*, J. Phys. Chem., **88**(24): 5770–5772 (1984)
- [177] R. Morales-Cueto, M. Esquivelzeta-Rabell, J. Saucedo-Zugazagoitia und J. Peon, *Singlet Excited-State Dynamics of Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons: Direct Measurements by Femtosecond Fluorescence Up-Conversion*, J. Phys. Chem. A, **111**(4): 552–557 (2007)
- [178] M. A. Schwörer, *Mechanismen der lichtinduzierten Freisetzung von Abgangsgruppen aus 2-Nitrobenzylverbindungen*, Doktorarbeit, Universität Basel (2004)
- [179] J. Morrison, H. Osthoff und P. Wan, *Photoredox, photodecarboxylation, and photo-retro-Aldol chemistry of p-nitrobiphenyls*, Photochem. Photobiol. Sci., **1**(6): 384–394 (2002)
- [180] A. Barth, S. R. Martin und J. E. T. Corrie, *Decarboxylation is a significant reaction pathway for photolabile calcium chelators and related compounds*, Photochem. Photobiol. Sci., **5**(1): 107–115 (2006)
- [181] F. Bley, K. Schaper und H. Görner, *Photoprocesses of Molecules with 2-Nitrobenzyl Protecting Groups and Caged Organic Acids*, Photochem. Photobiol., **84**(1): 162–171 (2008)
- [182] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer und J. Wirz, *Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP*, J. Am. Chem. Soc., **126**(14): 4581–4595 (2004)
- [183] M. Schwörer und J. Wirz, *Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds in Solution, I. 2-Nitrotoluene: Thermodynamic and Kinetic Parameters of the aci-Nitro Tautomer*, Helv. Chim. Acta, **84**(6): 1441–1458 (2001)
- [184] J. Sankaranarayanan, S. Muthukrishnan und A. D. Gudmundsdottir, *Photoremovable protecting groups based on photoenolization*, in J. Richard, Herausgeber, *Advances in Physical Organic Chemistry*, Band Volume 43, 39–77, Academic Press (2009)
- [185] K. Schaper, M. Etinski und T. Fleig, *Theoretical Investigation of the Excited States of 2-Nitrobenzyl and 4,5-Methylenedioxy-2-nitrobenzyl Caging Groups*, Photochem. Photobiol., **85**(5): 1075–1081 (2009)
- [186] P. Wan und S. Muralidharan, *Structure and mechanism in the photo-retro-aldol type reactions of nitrobenzyl derivatives. Photochemical heterolytic cleavage of carbon-carbon bonds*, J. Am. Chem. Soc., **110**(13): 4336–4345 (1988)
- [187] G. Schäfer, *Charakterisierung der Photoreaktion der lichtgetriebenen Protonenpumpe Proteorhodopsin mit IR-Spektroskopie und die Entwicklung einer Methodik zur*

- Untersuchung von Carboxylierungsreaktionen am Beispiel von RuBisCO*, Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (2009)
- [188] M. Volk, Y. Kholodenko, H. S. M. Lu, E. A. Gooding, W. F. DeGrado und R. M. Hochstrasser, *Peptide Conformational Dynamics and Vibrational Stark Effects Following Photoinitiated Disulfide Cleavage*, J. Phys. Chem. B, **101**(42): 8607–8616 (1997)
- [189] J. Bayly, V. Kartha und W. Stevens, *The absorption spectra of liquid phase H₂O, HDO and D₂O from 0,7 μm to 10 μm*, Infrared Phys., **3**(4): 211–222 (1963)
- [190] E. Pepler, *unveröffentlichte Resultate*
- [191] H. Satzger, *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeitspektroskopie*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (2004)
- [192] T. Schrader, A. Sieg, F. Koller, W. Schreier, Q. An, W. Zinth und P. Gilch, *Vibrational relaxation following ultrafast internal conversion: comparing IR and Raman probing*, Chem. Phys. Lett., **392**(4-6): 358–364 (2004)
- [193] A. Sieg, *Femtosekundenspektroskopie im mittleren Infraroten: Energierelaxation in para-Nitroanilin und Konformationsdynamik von Azobenzolpeptiden*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (2005)
- [194] B. B. Craig, R. G. Weiss und S. J. Atherton, *Picosecond and nanosecond laser photolyses of p-nitrophenylacetate in aqueous media: a photoadiabatic decarboxylation process?*, J. Phys. Chem., **91**(23): 5906–5912 (1987)
- [195] J. Mewes, *unveröffentlichte Resultate* (2010)
- [196] A. Kandratsenka, J. Schroeder, D. Schwarzer und V. S. Vikhrenko, *Molecular dynamics modeling of cooling of vibrationally highly excited carbon dioxide produced in the photodissociation of organic peroxides in solution*, Phys. Chem. Chem. Phys., **7**(6): 1205–1213 (2005)
- [197] J. E. T. Corrie, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham und A. Barth, *Studies of decarboxylation in photolysis of α-carboxy-2-nitrobenzyl (CNB) caged compounds*, Photochem. Photobiol. Sci., **7**(1): 84–97 (2008)
- [198] M. J. Tauber, R. A. Mathies, X. Chen und S. E. Bradforth, *Flowing liquid sample jet for resonance Raman and ultrafast optical spectroscopy*, Rev. Sci. Instrum., **74**(11): 4958–4960 (2003)
- [199] O. Béjà, L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich und E. F. DeLong, *Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea*, Science, **289**(5486): 1902–1906 (2000)

- [200] O. Bèjà, E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc und E. F. DeLong, *Proteorhodopsin phototrophy in the ocean*, Nature, **411**(6839): 786–789 (2001)
- [201] D. Oesterhelt und W. Stoeckenius, *Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium.*, Nat. New Biol., **233**(39): 149–152 (1971)
- [202] D. Oesterhelt und W. Stoeckenius, *Functions of a New Photoreceptor Membrane*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**(10): 2853–2857 (1973)
- [203] R. A. Bogomolni und J. L. Spudich, *Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic Halobacterium halobium*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**(20): 6250–6254 (1982)
- [204] T. Takahashi, Y. Mochizuki, N. Kamo und Y. Kobatake, *Evidence that the long-lifetime photointermediate of s-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in halobacterium halobium*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **127**(1): 99–105 (1985)
- [205] A. Blanck, D. Oesterhelt, E. Ferrando, E. S. Schegk und F. Lottspeich, *Primary structure of sensory rhodopsin I, a prokaryotic photoreceptor.*, EMBO J., **8**(13): 3963–3971 (1989)
- [206] D. Oesterhelt, *The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea*, Curr. Opin. Struct. Biol., **8**(4): 489–500 (1998)
- [207] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg und P. Hegemann, *Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae*, Science, **296**(5577): 2395–2398 (2002)
- [208] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann und E. Bamberg, *Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**(24): 13940–13945 (2003)
- [209] G. Sabeji, R. Massana, J. P. Bielawski, M. Rosenberg, E. F. DeLong und O. Bèjà, *Novel Proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas*, Environ. Microbiol., **5**(10): 842–849 (2003)
- [210] J. R. de la Torre, L. M. Christianson, O. Bèjà, M. T. Suzuki, D. M. Karl, J. Heidelberg und E. F. DeLong, *Proteorhodopsin genes are distributed among divergent marine bacterial taxa*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**(22): 12830–12835 (2003)
- [211] J. C. Venter, K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.-H. Rogers und H. O. Smith, *Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea*, Science, **304**(5667): 66–74 (2004)

- [212] D. B. Rusch, A. L. Halpern, G. Sutton, K. B. Heidelberg, S. Williamson, S. Yooseph, D. Wu, J. A. Eisen, J. M. Hoffman, K. Remington, K. Beeson, B. Tran, H. Smith, H. Baden-Tillson, C. Stewart, J. Thorpe, J. Freeman, C. Andrews-Pfannkoch, J. E. Venter, K. Li, S. Kravitz, J. F. Heidelberg, T. Utterback, Y.-H. Rogers, L. I. Falcón, V. Souza, G. Bonilla-Rosso, L. E. Eguiarte, D. M. Karl, S. Sathyendranath, T. Platt, E. Bermingham, V. Gallardo, G. Tamayo-Castillo, M. R. Ferrari, R. L. Strausberg, K. Nealson, R. Friedman, M. Frazier und J. C. Venter, *The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific.*, PLoS Biol., **5**(3): e77 (2007)
- [213] D. L. Man, W. W. Wang, G. Sabeji, L. Aravind, A. F. Post, R. Massana, E. N. Spudich, J. L. Spudich und O. Béjà, *Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins*, EMBO J., **22**(8): 1725–1731 (2003), 666CW EMBO J
- [214] W.-W. Wang, O. A. Sineshchekov, E. N. Spudich und J. L. Spudich, *Spectroscopic and Photochemical Characterization of a Deep Ocean Proteorhodopsin*, J. Biol. Chem., **278**(36): 33985–33991 (2003)
- [215] T. Friedrich, S. Geibel, R. Kalmbach, I. Chizhov, K. Ataka, J. Heberle, M. Engelhard und E. Bamberg, *Proteorhodopsin is a Light-driven Proton Pump with Variable Vectoriality*, J. Mol. Biol., **321**(5): 821–838 (2002)
- [216] H. Luecke, B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailler und J. K. Lanyi, *Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution*, J. Mol. Biol., **291**(4): 899–911 (1999)
- [217] J. R. Hillebrecht, J. Galan, R. Rangarajan, L. Ramos, K. McCleary, D. E. Ward, J. A. Stuart und R. R. Birge, *Structure, Function, and Wavelength Selection in Blue-Absorbing Proteorhodopsin*, Biochemistry, **45**(6): 1579–1590 (2006)
- [218] R. Krebs, U. Alexiev, R. Partha, A. DeVita und M. Braiman, *Detection of fast light-activated H⁺ release and M intermediate formation from proteorhodopsin.*, BMC Physiol., **2**(1): 5 (2002)
- [219] A. K. Dioumaev, J. M. Wang, Z. Balint, G. Varo und J. K. Lanyi, *Proton Transport by Proteorhodopsin Requires that the Retinal Schiff Base Counterion Asp-97 Be Anionic*, Biochemistry, **42**(21): 6582–6587 (2003)
- [220] J. M. Kralj, V. B. Bergo, J. J. Amsden, E. N. Spudich, J. L. Spudich und K. J. Rothschild, *Protonation state of Glu142 differs in the green- and blue-absorbing variants of proteorhodopsin.*, Biochemistry, **47**(11): 3447–3453 (2008)
- [221] É. Lörinczi, M.-K. Verhoefen, J. Wachtveitl, A. C. Woerner, C. Glaubitz, M. Engelhard, E. Bamberg und T. Friedrich, *Voltage- and pH-Dependent Changes in Vectoriality of Photocurrents Mediated by Wild-type and Mutant Proteorhodopsins upon Expression in Xenopus Oocytes*, J. Mol. Biol., **393**(2): 320–341 (2009)

- [222] A. K. Dioumaev, L. S. Brown, J. Shih, E. N. Spudich, J. L. Spudich und J. K. Lanyi, *Proton Transfers in the Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin*, *Biochemistry*, **41**(17): 5348–5358 (2002)
- [223] Y. Xiao, R. Partha, R. Krebs und M. Braiman, *Time-Resolved FTIR Spectroscopy of the Photointermediates Involved in Fast Transient H⁺ Release by Proteorhodopsin*, *J. Phys. Chem. B*, **109**(1): 634–641 (2005)
- [224] J. K. Lanyi, *Halorhodopsin, a light-driven electrogenic chloride-transport system*, *Physiol. Rev.*, **70**(2): 319–330 (1990)
- [225] L. S. Brown, A. K. Dioumaev, R. Needleman und J. K. Lanyi, *Local-Access Model for Proton Transfer in Bacteriorhodopsin*, *Biochemistry*, **37**(11): 3982–3993 (1998)
- [226] U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg und D. Oesterhelt, *General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model*, *Biochemistry*, **36**(1): 2–7 (1997)
- [227] U. Haupts, J. Tittor und D. Oesterhelt, *Closing in on Bacteriorhodopsin: Progress in Understanding the Molecule*, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**(1): 367–399 (1999)
- [228] J. K. Lanyi, *Molecular Mechanism of Ion Transport in Bacteriorhodopsin: Insights from Crystallographic, Spectroscopic, Kinetic, and Mutational Studies*, *J. Phys. Chem. B*, **104**(48): 11441–11448 (2000)
- [229] R. A. Krebs, D. Dunmire, R. Partha und M. S. Braiman, *Resonance Raman Characterization of Proteorhodopsin's Chromophore Environment*, *J. Phys. Chem. B*, **107**(31): 7877–7883 (2003)
- [230] R. Rangarajan, J. F. Galan, G. Whited und R. R. Birge, *Mechanism of Spectral Tuning in Green-Absorbing Proteorhodopsin*, *Biochemistry*, **46**(44): 12679–12686 (2007)
- [231] B. R. Kelemen, M. Du und R. B. Jensen, *Proteorhodopsin in living color: diversity of spectral properties within living bacterial cells*, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1618**(1): 25–32 (2003)
- [232] J. Herz, *Untersuchung der primären Photodynamik von Proteorhodopsin mit spezifisch modifiziertem Protonenakzeptorkomplex*, Masterarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität (2010)
- [233] V. B. Bergo, O. A. Sineshchekov, J. M. Kralj, R. Partha, E. N. Spudich, K. J. Rothschild und J. L. Spudich, *His-75 in Proteorhodopsin, a Novel Component in Light-driven Proton Translocation by Primary Pumps*, *J. Biol. Chem.*, **284**(5): 2836–2843 (2009)

- [234] N. Pflieger, A. C. Wörner, J. Yang, S. Shastri, U. A. Hellmich, L. Aslimovska, M. S. Maier und C. Glaubitz, *Solid-state NMR and functional studies on proteorhodopsin*, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1787**(6): 697–705 (2009)
- [235] M. Lakatos, J. K. Lanyi, J. Szakács und G. Váró, *The Photochemical Reaction Cycle of Proteorhodopsin at Low pH*, *Biophys. J.*, **84**(5): 3252–3256 (2003)
- [236] M. Lakatos und G. Váró, *The influence of water on the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin at low and high pH*, *J. Photochem. Photobiol., B*, **73**(3): 177–182 (2004)
- [237] R. Huber, T. Köhler, M. O. Lenz, E. Bamberg, R. Kalmbach, M. Engelhard und J. Wachtveitl, *pH-Dependent Photoisomerization of Retinal in Proteorhodopsin*, *Biochemistry*, **44**(6): 1800–1806 (2005)
- [238] M. O. Lenz, R. Huber, B. Schmidt, P. Gilch, R. Kalmbach, M. Engelhard und J. Wachtveitl, *First Steps of Retinal Photoisomerization in Proteorhodopsin*, *Biophys. J.*, **91**(1): 255–262 (2006)
- [239] E. S. Imasheva, K. Shimono, S. P. Balashov, J. M. Wang, U. Zadok, M. Sheves, N. Kamo und J. K. Lanyi, *Formation of a Long-Lived Photoproduct with a Deprotonated Schiff Base in Proteorhodopsin, and Its Enhancement by Mutation of Asp227*, *Biochemistry*, **44**(32): 10828–10838 (2005)
- [240] N. Pflieger, M. Lorch, A. Woerner, S. Shastri und C. Glaubitz, *Characterisation of Schiff base and chromophore in green proteorhodopsin by solid-state NMR*, *J. Biomol. NMR*, **40**(1): 15–21 (2008)
- [241] H. Abramczyk, *Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin and its retinal modified analogs: Revision of commonly accepted interpretation of electronic spectra of transient intermediates in the bacteriorhodopsin photocycle*, *J. Chem. Phys.*, **120**(23): 11120–11132 (2004)
- [242] I. P. Hohenfeld, A. A. Wegener und M. Engelhard, *Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **442**(2-3): 198–202 (1999)
- [243] K. Neumann, M.-K. Verhoeven, I. Weber, C. Glaubitz und J. Wachtveitl, *Initial Reaction Dynamics of Proteorhodopsin Observed by Femtosecond Infrared and Visible Spectroscopy*, *Biophys. J.*, **94**(12): 4796–4807 (2008)
- [244] M. O. Lenz, *Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen photoinduzierter Ladungstransferreaktionen*, Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (2005)
- [245] Y. Furutani, D. Ikeda, M. Shibata und H. Kandori, *Strongly hydrogen-bonded water molecule is observed only in the alkaline form of proteorhodopsin*, *Chem. Phys.*, **324**(2-3): 705–708 (2006)

- [246] D. Ikeda, Y. Furutani und H. Kandori, *FTIR Study of the Retinal Schiff Base and Internal Water Molecules of Proteorhodopsin*, *Biochemistry*, **46**(18): 5365–5373 (2007)
- [247] B. Aton, A. G. Doukas, R. H. Callender, B. Becher und T. G. Ebrey, *Resonance Raman studies of the purple membrane*, *Biochemistry*, **16**(13): 2995–2999 (1977)
- [248] R. van den Berg, D. Jeon-Jang, H. C. Bitting und M. El-Sayed, *Subpicosecond resonance Raman spectra of the early intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin*, *Biophys. J.*, **58**(1): 135–141 (1990)
- [249] V. Bergo, J. J. Amsden, E. N. Spudich, J. L. Spudich und K. J. Rothschild, *Structural Changes in the Photoactive Site of Proteorhodopsin during the Primary Photoreaction*, *Biochemistry*, **43**(28): 9075–9083 (2004)
- [250] J. Herbst, K. Heyne und R. Diller, *Femtosecond Infrared Spectroscopy of Bacteriorhodopsin Chromophore Isomerization*, *Science*, **297**(5582): 822–825 (2002)
- [251] R. Gross, C. Schumann, M. M. N. Wolf, J. Herbst, R. Diller, N. Friedman und M. Sheves, *Ultrafast Protein Conformational Alterations in Bacteriorhodopsin and Its Locked Analogue BR5.12*, *J. Phys. Chem. B*, **113**(22): 7851–7860 (2009)
- [252] J. J. Amsden, J. M. Kralj, V. B. Bergo, E. N. Spudich, J. L. Spudich und K. J. Rothschild, *Different Structural Changes Occur in Blue- and Green-Proteorhodopsins during the Primary Photoreaction*, *Biochemistry*, **47**(44): 11490–11498 (2008)
- [253] J. J. Amsden, J. M. Kralj, L. R. Chieffo, X. Wang, S. Erramilli, E. N. Spudich, J. L. Spudich, L. D. Ziegler und K. J. Rothschild, *Subpicosecond Protein Backbone Changes Detected during the Green-Absorbing Proteorhodopsin Primary Photoreaction*, *J. Phys. Chem. B*, **111**(40): 11824–11831 (2007)
- [254] A. Rupenyan, I. van Stokkum, J. C. Arents, R. van Grondelle, K. Hellingwerf und M. L. Groot, *Characterization of the Primary Photochemistry of Proteorhodopsin with Femtosecond Spectroscopy*, *Biophys. J.*, **94**(10): 4020–4030 (2008)
- [255] A. Rupenyan, I. H. M. van Stokkum, J. C. Arents, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf und M. L. Groot, *Reaction Pathways of Photoexcited Retinal in Proteorhodopsin Studied by Pump–Dump–Probe Spectroscopy*, *J. Phys. Chem. B*, **113**(50): 16251–16256 (2009)
- [256] R. Diller, R. Jakober, C. Schumann, F. Peters, J. P. Klare und M. Engelhard, *The trans-cis isomerization reaction dynamics in sensory rhodopsin II by femtosecond time-resolved midinfrared spectroscopy: Chromophore and protein dynamics*, *Biopolymers*, **82**(4): 358–362 (2006)
- [257] F. Peters, J. Herbst, J. Tittor, D. Oesterhelt und R. Diller, *Primary reaction dynamics of halorhodopsin, observed by sub-picosecond IR - vibrational spectroscopy*, *Chem. Phys.*, **323**(1): 109–116 (2006)

- [258] M.-K. Verhoefen, *Funktionelle Dynamik des Retinalchromophors in verschiedenen Rhodopsinen*, Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt (2010)
- [259] J. Szakács, M. Lakatos, C. Ganea und G. Váró, *Kinetic isotope effects in the photochemical reaction cycle of ion transporting retinal proteins*, J. Photochem. Photobiol., B, **79**(2): 145–150 (2005)
- [260] T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts und D. Oesterhelt, *The initial reaction dynamics of the light-driven chloride pump halorhodopsin*, Chem. Phys. Lett., **241**(5-6): 559–565 (1995)
- [261] R. A. Mathies, C. H. B. Cruz, W. T. Pollard und C. V. Shank, *Direct Observation of the Femtosecond Excited-State cis-trans Isomerization in Bacteriorhodopsin*, Science, **240**(4853): 777–779 (1988)
- [262] J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser und D. Oesterhelt, *Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy*, Chem. Phys. Lett., **144**(2): 215–220 (1988)
- [263] I. Lutz, A. Sieg, A. A. Wegener, M. Engelhard, I. Boche, M. Otsuka, D. Oesterhelt, J. Wachtveitl und W. Zinth, *Primary reactions of sensory rhodopsins*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**(3): 962–967 (2001)
- [264] R. Diller, *Vibrational relaxation during the retinal isomerization in Bacteriorhodopsin*, Chem. Phys. Lett., **295**(1-2): 47–55 (1998)
- [265] R. Diller, S. Maiti, G. C. Walker, B. R. Cowen, R. Pippenger, R. A. Bogomolni und R. M. Hochstrasser, *Femtosecond time-resolved infrared laser study of the J-K transition of bacteriorhodopsin*, Chem. Phys. Lett., **241**(1-2): 109–115 (1995)
- [266] S. L. Dexheimer, Q. Wang, L. A. Peteanu, W. T. Pollard, R. A. Mathies und C. V. Shank, *Femtosecond impulsive excitation of nonstationary vibrational states in bacteriorhodopsin*, Chem. Phys. Lett., **188**(1-2): 61–66 (1992)
- [267] L. Song und M. A. El-Sayed, *Primary Step in Bacteriorhodopsin Photosynthesis: Bond Stretch Rather than Angle Twist of Its Retinal Excited-State Structure*, J. Am. Chem. Soc., **120**(34): 8889–8890 (1998)
- [268] G. H. Atkinson, L. Ujj und Y. Zhou, *Vibrational Spectrum of the J-625 Intermediate in the Room Temperature Bacteriorhodopsin Photocycle*, J. Phys. Chem. A, **104**(18): 4130–4139 (2000)
- [269] M. O. Lenz, A. C. Woerner, C. Glaubitz und J. Wachtveitl, *Photoisomerization in Proteorhodopsin Mutant D97N*, Photochem. Photobiol., **83**(2): 226–231 (2007)
- [270] T. Köhler, *unveröffentlichte Resultate* (2010)

- [271] F. Garczarek und K. Gerwert, *Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy*, *Nature*, **439**(7072): 109–112 (2006)
- [272] I. Radu, C. Bamann, M. Nack, G. Nagel, E. Bamberg und J. Heberle, *Conformational Changes of Channelrhodopsin-2*, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(21): 7313–7319 (2009)
- [273] M. Nack, I. Radu, C. Bamann, E. Bamberg und J. Heberle, *The retinal structure of channelrhodopsin-2 assessed by resonance Raman spectroscopy*, *FEBS Lett.*, **583**(22): 3676–3680 (2009)
- [274] A. Fissi, O. Pieroni und F. Ciardelli, *Photoresponsive polymers: Azobenzene-containing poly(L-lysine)*, *Biopolymers*, **26**(12): 1993–2007 (1987)
- [275] L. Ulysse und J. Chmielewski, *The synthesis of a light-switchable amino acid for inclusion into conformationally mobile peptides*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**(17): 2145–2146 (1994)
- [276] L. Ulysse, J. Cubillos und J. Chmielewski, *Photoregulation of cyclic peptide conformation.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**(32): 8466–8467 (1995)
- [277] J. Wachtveitl, T. Nägele, B. Puell, W. Zinth, M. Krüger, S. Rudolph-Böhner, D. Oesterhelt und L. Moroder, *Ultrafast photoisomerization of azobenzene compounds*, *J. Photochem. Photobiol., A*, **105**(2-3): 283–288 (1997)
- [278] C. Renner, R. Behrendt, S. Spörlein, J. Wachtveitl und L. Moroder, *Photomodulation of conformational states. I. Mono- and bicyclic peptides with (4-amino)phenylazobenzoic acid as backbone constituent*, *Biopolymers*, **54**(7): 489–500 (2000)
- [279] C. Renner, J. Cramer, R. Behrendt und L. Moroder, *Photomodulation of conformational states. II. Mono- and bicyclic peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent*, *Biopolymers*, **54**(7): 501–514 (2000)
- [280] C. Renner, R. Behrendt, N. Heim und L. Moroder, *Photomodulation of conformational states. III. Water-soluble bis-cysteinyl-peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent*, *Biopolymers*, **63**(6): 382–393 (2002)
- [281] H. Satzger, C. Root, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl und W. Zinth, *Picosecond dynamics in water-soluble azobenzene-peptides*, *Chem. Phys. Lett.*, **396**(1-3): 191–197 (2004)
- [282] J. Bredenbeck, J. Helbing, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl und P. Hamm, *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(11): 6452–6457 (2003)

- [283] F. Koller, C. Sobotta, T. Schrader, T. Cordes, W. Schreier, A. Sieg und P. Gilch, *Slower processes of the ultrafast photo-isomerization of an azobenzene observed by IR spectroscopy*, Chem. Phys., **341**(1-3): 258–266 (2007)
- [284] T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Löweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan und W. Zinth, *Light-triggered β -hairpin folding and unfolding*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **104**(40): 15729–15734 (2007)
- [285] J. R. Kumita, O. S. Smart und G. A. Woolley, *Photo-control of helix content in a short peptide*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**(8): 3803–3808 (2000)
- [286] G. A. Woolley, *Photocontrolling Peptide α -Helices*, Acc. Chem. Res., **38**(6): 486–493 (2005)
- [287] L. C. Cross und W. Klyne, *Report from IUPAC Commission on Nomenclature of Organic-Chemistry – Rules for Nomenclature of Organic-Chemistry Section E: Stereochemistry*, Pure Appl. Chem., **45**(1): 13–30 (1976)
- [288] G. P. Moss, *Basic Terminology of Stereochemistry*, Pure Appl. Chem., **68**: 2193–2222 (1996)
- [289] E. Mitscherlich, *Ueber das Stickstoffbenzid*, Annalen der Physik und Chemie, **108**(15): 225–227 (1834)
- [290] G. S. Hartley, *The Cis-form of Azobenzene*, Nature, **140**(3537): 281 (1937)
- [291] A. H. Cook, *The preparation of some cis-azo-compounds*, J. Chem. Soc., -: 876–881 (1938)
- [292] J. M. Robertson, *Crystal structure and configuration of the isomeric azobenzenes*, J. Chem. Soc., 232–236 (1939)
- [293] <http://www.isiknowledge.com>
- [294] H. Rau, *Spectroscopic Properties of Organic Azo Compounds*, Angew. Chem., Int. Ed., **12**(3): 224–235 (1973)
- [295] H. Rau, *Azo Compounds*, in H. Dürr und H. Bouas-Laurent, Herausgeber, *Photochromism*, Studies in organic chemistry, Kapitel 4, 165–192, Elsevier Science, Amsterdam (1990)
- [296] C. J. Brown, *A refinement of the crystal structure of azobenzene*, Acta Cryst., **21**(1): 146–152 (1966)
- [297] J. A. Bouwstra, A. Schouten und J. Kroon, *Structural studies of the system trans-azobenzene/trans-stilbene. I. A reinvestigation of the disorder in the crystal structure of trans-azobenzene*, C₁₂H₁₀N₂, Acta Cryst. C, **39**(8): 1121–1123 (1983)

- [298] M. Traetteberg, I. Hillmo und K. Hagen, *A gas electron diffraction study of the molecular structure of trans-azobenzene*, J. Mol. Struct., **39**(2): 231–239 (1977)
- [299] J. Harada, K. Ogawa und S. Tomoda, *Molecular Motion and Conformational Interconversion of Azobenzenes in Crystals as Studied by X-ray Diffraction*, Acta Cryst. B, **53**(4): 662–672 (1997)
- [300] T. Tsuji, H. Takashima, H. Takeuchi, T. Egawa und S. Konaka, *Molecular Structure and Torsional Potential of trans-Azobenzene. A Gas Electron Diffraction Study*, J. Phys. Chem. A, **105**(41): 9347–9353 (2001)
- [301] N. Biswas und S. Umapathy, *Density Functional Calculations of Structures, Vibrational Frequencies, and Normal Modes of trans- and cis-Azobenzene*, J. Phys. Chem. A, **101**(30): 5555–5566 (1997)
- [302] C. Hättig und K. Hald, *Implementation of RI-CC2 triplet excitation energies with an application to trans-azobenzene.*, Phys. Chem. Chem. Phys., **4**(11): 2111–2118 (2002)
- [303] H. Fliegl, A. Kohn, C. Hattig und R. Ahlrichs, *Ab Initio Calculation of the Vibrational and Electronic Spectra of trans- and cis-Azobenzene*, J. Am. Chem. Soc., **125**(32): 9821–9827 (2003)
- [304] A. Cembran, F. Bernardi, M. Garavelli, L. Gagliardi und G. Orlandi, *On the Mechanism of the cis–trans Isomerization in the Lowest Electronic States of Azobenzene: S_0 , S_1 , and T_1* , J. Am. Chem. Soc., **126**(10): 3234–3243 (2004)
- [305] G. C. Hampson und J. M. Robertson, *Bond lengths and resonance in the cis-azobenzene molecule*, J. Chem. Soc., **1**: 409–413 (1941)
- [306] J. J. de Lange, J. M. Robertson und I. Woodward, *X-Ray Crystal Analysis of Trans-Azobenzene*, Proc. R. Soc. Lond. A, **171**(946): 398–410 (1939)
- [307] A. Mostad und C. Romming, *A Refinement of the Crystal Structure of cis-Azobenzene.*, Acta Chem. Scand., **25**: 3561–3568 (1971)
- [308] T. Cusati, G. Granucci, M. Persico und G. Spighi, *Oscillator strength and polarization of the forbidden $n \rightarrow \pi^*$ band of trans-azobenzene: A computational study*, J. Chem. Phys., **128**(19): 194312 (2008)
- [309] A. Biancalana, E. Campani, G. Di Domenico, G. Gorini, A. Iacoponi und G. Masetti, *Direct observation of a 220 cm^{-1} structure in the lowest $\pi-\pi^*$ absorption band in the vapour phase of trans-azobenzene*, Spectrochim. Acta, Part A, **55**(14): 2883–2887 (1999)
- [310] T. Fujino, S. Y. Arzhantsev und T. Tahara, *Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Study of Photoisomerization of trans-Azobenzene*, J. Phys. Chem. A, **105**(35): 8123–8129 (2001)

- [311] P. Bortolus und S. Monti, *Cis-trans photoisomerization of azobenzene. Solvent and triplet donors effects*, J. Phys. Chem., **83**(6): 648–652 (1979)
- [312] J. Wachtveitl, T. Nägele, A. Wurzer, M. Schenk und L. Moroder, *Ultrafast photomodulation of conformation in azobenzene containing cyclic peptides*, in T. Elsaesser, J. Fujimoto, D. A. Wiersma und W. Zinth, Herausgeber, *Ultrafast Phenomena XI*, Band 63 von *Springer Series in Chemical Physics*, 609–611, Springer-Verlag Berlin (1998)
- [313] W. Fuß, C. Kosmidis, W. E. Schmid und S. A. Trushin, *The Photochemical cis-trans Isomerization of Free Stilbene Molecules Follows a Hula-Twist Pathway*, Angew. Chem., Int. Ed., **43**(32): 4178–4182 (2004)
- [314] A. M. Müller, S. Lochbrunner, W. E. Schmid und W. Fuß, *Low-Temperature Photochemistry of Previtamin D: A Hula-Twist Isomerization of a Triene*, Angew. Chem., Int. Ed., **37**(4): 505–507 (1998)
- [315] R. S. H. Liu, D. Mead und A. E. Asato, *Application of the H.T.-n mechanism of photoisomerization to the photocycles of bacteriorhodopsin. A model study*, J. Am. Chem. Soc., **107**(23): 6609–6614 (1985)
- [316] E. W.-G. Diau, *A New Trans-to-Cis Photoisomerization Mechanism of Azobenzene on the $S_1(n\pi^*)$ Surface*, J. Phys. Chem. A, **108**(6): 950–956 (2004)
- [317] N. Tamai und H. Miyasaka, *Ultrafast Dynamics of Photochromic Systems*, Chem. Rev., **100**(5): 1875–1890 (2000)
- [318] H. Rau und E. Lueddecke, *On the rotation-inversion controversy on photoisomerization of azobenzenes. Experimental proof of inversion*, J. Am. Chem. Soc., **104**(6): 1616–1620 (1982)
- [319] H. Rau und S. Yu-Quan, *Photoisomerization of sterically hindered azobenzenes*, J. Photochem. Photobiol., A, **42**(2): 321–327 (1988)
- [320] I. K. Lednev, T.-Q. Ye, R. E. Hester und J. N. Moore, *Femtosecond Time-Resolved UV-Visible Absorption Spectroscopy of trans-Azobenzene in Solution*, J. Phys. Chem., **100**(32): 13338–13341 (1996)
- [321] I. K. Lednev, T. Q. Ye, P. Matousek, M. Towrie, P. Foggi, F. V. R. Neuwahl, S. Umaphy, R. E. Hester und J. N. Moore, *Femtosecond time-resolved UV-visible absorption spectroscopy of trans-azobenzene: dependence on excitation wavelength*, Chem. Phys. Lett., **290**(1-3): 68–74 (1998)
- [322] I. K. Lednev, T.-Q. Ye, L. C. Abbott, R. E. Hester und J. N. Moore, *Photoisomerization of a Capped Azobenzene in Solution Probed by Ultrafast Time-Resolved Electronic Absorption Spectroscopy*, J. Phys. Chem. A, **102**(46): 9161–9166 (1998)

- [323] T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth und J. Wachtveitl, *Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene*, Chem. Phys. Lett., **272**(5-6): 489–495 (1997)
- [324] M. Terazima, M. Takezaki, S. Yamaguchi und N. Hirota, *Thermalization after photoexcitation to the S_2 state of trans-azobenzene in solution*, J. Chem. Phys., **109**(2): 603–609 (1998)
- [325] T. Fujino und T. Tahara, *Picosecond Time-Resolved Raman Study of trans-Azobenzene*, J. Phys. Chem. A, **104**(18): 4203–4210 (2000)
- [326] H. Satzger, S. Spörlein, C. Root, J. Wachtveitl, W. Zinth und P. Gilch, *Fluorescence spectra of trans- and cis-azobenzene – emission from the Franck-Condon state*, Chem. Phys. Lett., **372**(1-2): 216–223 (2003)
- [327] H. Satzger, C. Root und M. Braun, *Excited-State Dynamics of trans- and cis-Azobenzene after UV Excitation in the $\pi\pi^*$ Band*, J. Phys. Chem. A, **108**(30): 6265–6271 (2004)
- [328] A. Stolow, *Femtosecond Time-resolved Photoelectron Spectroscopy of Polyatomic Molecules*, Annu. Rev. Phys. Chem., **54**(1): 89–119 (2003)
- [329] T. Schultz, J. Quenneville, B. Levine, A. Toniolo, T. J. Martinez, S. Lochbrunner, M. Schmitt, J. P. Shaffer, M. Z. Zgierski und A. Stolow, *Mechanism and Dynamics of Azobenzene Photoisomerization*, J. Am. Chem. Soc., **125**(27): 8098–8099 (2003)
- [330] Y. C. Lu, C. W. Chang und E. W. G. Diau, *Femtosecond fluorescence dynamics of trans-azobenzene in hexane on excitation to the $S_1(n\pi^*)$ state*, J. Chin. Chem. Soc., **49**(5): 693–701 (2002)
- [331] T. Ishikawa, T. Noro und T. Shoda, *Theoretical study on the photoisomerization of azobenzene*, J. Chem. Phys., **115**(16): 7503–7512 (2001)
- [332] Y.-C. Lu, E. W.-G. Diau und H. Rau, *Femtosecond Fluorescence Dynamics of Rotation-Restricted Azobenzenophanes: New Evidence on the Mechanism of trans \rightarrow cis Photoisomerization of Azobenzene*, J. Phys. Chem. A, **109**(10): 2090–2099 (2005)
- [333] T. Pancur, *Untersuchung der Isomerisierungsdynamik von Azobenzolen und der strahlungslosen Desaktivierung von Nucleobasen mit Hilfe der Femtosekunden-Fluoreszenzspektroskopie*, Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2004)
- [334] T. Pancur, F. Renth, F. Temps, B. Harbaum, A. Kruger, R. Herges und C. Nather, *Femtosecond fluorescence up-conversion spectroscopy of a rotation-restricted azobenzene after excitation to the S_1 state*, Phys. Chem. Chem. Phys., **7**(9): 1985–1989 (2005)

- [335] C.-W. Chang, Y.-C. Lu, T.-T. Wang und E. W.-G. Diau, *Photoisomerization Dynamics of Azobenzene in Solution with S_1 Excitation: A Femtosecond Fluorescence Anisotropy Study*, J. Am. Chem. Soc., **126**(32): 10109–10118 (2004)
- [336] D. Tanner und O. Wennerström, *[2,2] (4,4')-stilbenophane*, Tetrahedron Lett., **22**(24): 2313–2316 (1981)
- [337] N. Biswas und S. Umaphathy, *Wavepacket dynamical studies on trans-azobenzene: absorption spectrum and resonance Raman excitation profiles of the $n - \pi^*$ transition*, Chem. Phys. Lett., **236**(1-2): 24–29 (1995)
- [338] N. Biswas und S. Umaphathy, *Early time dynamics of trans-azobenzene isomerization in solution from resonance Raman intensity analysis*, J. Chem. Phys., **107**(19): 7849–7858 (1997)
- [339] C. M. Stuart, R. R. Frontiera und R. A. Mathies, *Excited-State Structure and Dynamics of cis- and trans-Azobenzene from Resonance Raman Intensity Analysis*, J. Phys. Chem. A, **111**(48): 12072–12080 (2007)
- [340] P. D. Chowdary und S. Umaphathy, *Ultrafast dynamics and photochemistry of $\pi\pi^*$ excited trans-azobenzene - a comprehensive analysis of resonance Raman intensities*, J. Raman Spectrosc., **39**(11): 1538–1555 (2008)
- [341] T. Saito und T. Kobayashi, *Conformational Change in Azobenzene in Photoisomerization Process Studied with Chirp-Controlled sub-10-fs Pulses*, J. Phys. Chem. A, **106**(41): 9436–9441 (2002)
- [342] S. Monti, G. Orlandi und P. Palmieri, *Features of the photochemically active state surfaces of azobenzene*, Chem. Phys., **71**(1): 87–99 (1982)
- [343] P. Cattaneo und M. Persico, *An abinitio study of the photochemistry of azobenzene*, Phys. Chem. Chem. Phys., **1**: 4739–4743 (1999)
- [344] T. Ikegami, N. Kurita, H. Sekino und Y. Ishikawa, *Mechanism of Cis-to-Trans Isomerization of Azobenzene: Direct MD Study*, J. Phys. Chem. A, **107**(22): 4555–4562 (2003)
- [345] L. Gagliardi, G. Orlandi, F. Bernardi, A. Cembran und M. Garavelli, *A theoretical study of the lowest electronic states of azobenzene: the role of torsion coordinate in the cis-trans photoisomerization*, Theor. Chem. Acc., **111**(2): 363–372 (2004)
- [346] I. Conti, M. Garavelli und G. Orlandi, *The Different Photoisomerization Efficiency of Azobenzene in the Lowest $n\pi^*$ and $\pi\pi^*$ Singlets: The Role of a Phantom State*, J. Am. Chem. Soc., **130**(15): 5216–5230 (2008)
- [347] M. L. Tiago, S. Ismail-Beigi und S. G. Louie, *Photoisomerization of azobenzene from first-principles constrained density-functional calculations*, J. Chem. Phys., **122**(9): 094311 (2005)

- [348] C. Ciminelli, G. Granucci und M. Persico, *The Photoisomerization Mechanism of Azobenzene: A Semiclassical Simulation of Nonadiabatic Dynamics*, Chem. Eur. J., **10**(9): 2327–2341 (2004)
- [349] A. Toniolo, C. Ciminelli, M. Persico und T. J. Martinez, *Simulation of the photodynamics of azobenzene on its first excited state: Comparison of full multiple spawning and surface hopping treatments*, J. Chem. Phys., **123**(23): 234308 (2005)
- [350] G. Granucci und M. Persico, *Excited state dynamics with the direct trajectory surface hopping method: azobenzene and its derivatives as a case study*, Theor. Chem. Acc., **117**(5): 1131–1143 (2007)
- [351] P. Sauer und R. E. Allen, *Multiple steps and multiple excitations in photoisomerization of azobenzene*, Chem. Phys. Lett., **450**(4-6): 192–195 (2008)
- [352] Y. Dou, Y. Hu, S. Yuan, W. Wu und H. Tang, *Detailed mechanism of trans \rightarrow cis photoisomerization of azobenzene studied by semiclassical dynamics simulation*, Mol. Phys., **107**(2): 181–190 (2009)
- [353] C. R. Crecca und A. E. Roitberg, *Theoretical Study of the Isomerization Mechanism of Azobenzene and Disubstituted Azobenzene Derivatives*, J. Phys. Chem. A, **110**(26): 8188–8203 (2006)
- [354] Y. Hirose, H. Yui und T. Sawada, *Effect of Potential Energy Gap between the $n\pi^*$ and the $\pi\pi^*$ State on Ultrafast Photoisomerization Dynamics of an Azobenzene Derivative*, J. Phys. Chem. A, **106**(13): 3067–3071 (2002)
- [355] N. Pozhidaeva, M.-E. Cormier, A. Chaudhari und G. A. Woolley, *Reversible Photocontrol of Peptide Helix Content: Adjusting Thermal Stability of the Cis State*, Bioconjugate Chem., **15**(6): 1297–1303 (2004)
- [356] O. Sadvovskii, A. Beharry, F. Zhang und G. Woolley, *Spectral Tuning of Azobenzene Photoswitches for Biological Applications*, Angew. Chem., Int. Ed., **48**(8): 1484–1486 (2009)
- [357] R. Behrendt, M. Schenk, H.-J. Musiol und L. Moroder, *Photomodulation of conformational states. Synthesis of cyclic peptides with backbone-azobenzene moieties*, J. Pept. Sci., **5**(11): 519–529 (1999)
- [358] R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterheld und L. Moroder, *Photomodulation of the Conformation of Cyclic Peptides with Azobenzene Moieties in the Peptide Backbone*, Angew. Chem., Int. Ed., **38**(18): 2771–2774 (1999)
- [359] S. Spörlein, H. Carstens, H. Satzger, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth und J. Wachtveitl, *Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**(12): 7998–8002 (2002)

- [360] J. Wachtveitl, S. Spörlein, H. Satzger, B. Fonrobert, C. Renner, R. Behrendt, D. Oesterhelt, L. Moroder und W. Zinth, *Ultrafast Conformational Dynamics in Cyclic Azobenzene Peptides of Increased Flexibility*, *Biophys. J.*, **86**(4): 2350–2362 (2004)
- [361] B. Brodsky und A. V. Persikov, *Molecular Structure of the Collagen Triple Helix*, in D. A. D. Parry und J. M. Squire, Herausgeber, *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*, Band 70, 301–339, Academic Press (2005)
- [362] C. L. Jenkins und R. T. Raines, *Insights on the conformational stability of collagen*, *Nat. Prod. Rep.*, **19**(1): 49–59 (2002)
- [363] R. Berisio, A. D. Simone, A. Ruggiero, R. Improta und L. Vitagliano, *Role of side chains in collagen triple helix stabilization and partner recognition*, *J. Pept. Sci.*, **15**(3): 131–140 (2009)
- [364] K. Okuyama, C. Hongo, R. Fukushima, G. Wu, H. Narita, K. Noguchi, Y. Tanaka und N. Nishino, *Crystal structures of collagen model peptides with Pro-Hyp-Gly repeating sequence at 1.26 Å resolution: Implications for proline ring puckering*, *Pept. Sci.*, **76**(5): 367–377 (2004)
- [365] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne, *The Protein Data Bank*, *Nucl. Acids Res.*, **28**(1): 235–242 (2000)
- [366] H. Berman, K. Henrick und H. Nakamura, *Announcing the worldwide Protein Data Bank*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **10**(12): 980–980 (2003)
- [367] J. Engel und D. J. Prockop, *The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper.*, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **20**: 137–152 (1991)
- [368] G. Fischer, *Chemical aspects of peptide bond isomerisation*, *Chem. Soc. Rev.*, **29**(2): 119–127 (2000)
- [369] W. J. Wedemeyer, E. Welker und H. A. Scheraga, *Proline Cis–Trans Isomerization and Protein Folding*, *Biochemistry*, **41**(50): 14637–14644 (2002)
- [370] A. Bachmann, T. Kiefhaber, S. Boudko, J. Engel und H. P. Bächinger, *Collagen triple-helix formation in all-trans chains proceeds by a nucleation/growth mechanism with a purely entropic barrier*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**(39): 13897–13902 (2005)
- [371] S. Giovannardi, L. Lando und A. Peres, *Flash Photolysis of Caged Compounds: Casting Light on Physiological Processes*, *News Physiol. Sci.*, **13**(5): 251–255 (1998)
- [372] U. Kusebauch, *Synthese und biophysikalische Charakterisierung von photoschaltbaren Kollagenmodellpeptiden*, Doktorarbeit, Universität Leipzig (2006)

- [373] U. Kusebauch, S. A. Cadamuro, H.-J. Musiol, M. O. Lenz, J. Wachtveitl, L. Moroder und C. Renner, *Photocontrolled Folding and Unfolding of a Collagen Triple Helix*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**(42): 7015–7018 (2006)
- [374] U. Kusebauch, S. A. Cadamuro, H.-J. Musiol, M. O. Lenz, J. Wachtveitl, L. Moroder und C. Renner, *Photocontrolled Folding and Unfolding of a Collagen Triple Helix – supporting materials*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**(42) (2006)
- [375] L. Lorenz, *Schnelle Photodynamik von organischen Pigmenten und azobenzolbasierten Photoschaltern*, Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (2009)
- [376] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5 Auflage (1995)
- [377] A. Barth, *The infrared absorption of amino acid side chains*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **74**(3-5): 141–173 (2000)
- [378] T. Nägele, *Ultraschnelle Photoisomerisierung von Azobenzolen*, Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1998)
- [379] S. A. Kovalenko, R. Schanz, H. Hennig und N. P. Ernsting, *Cooling dynamics of an optically excited molecular probe in solution from femtosecond broadband transient absorption spectroscopy*, *J. Chem. Phys.*, **115**(7): 3256–3273 (2001)
- [380] E. T. Nibbering, H. Fidder und E. Pines, *Ultrafast Chemistry: Using Time-Resolved Vibrational Spectroscopy for Interrogation of Structural Dynamics*, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **56**(1): 337–367 (2005)
- [381] M. L. Horng, J. A. Gardecki, A. Papazyan und M. Maroncelli, *Subpicosecond Measurements of Polar Solvation Dynamics: Coumarin 153 Revisited*, *J. Phys. Chem.*, **99**(48): 17311–17337 (1995)
- [382] U. Kusebauch, S. Cadamuro, H.-J. Musiol, L. Moroder und C. Renner, *Photocontrol of the Collagen Triple Helix: Synthesis and Conformational Characterization of Bis-cysteinyl Collagenous Peptides with an Azobenzene Clamp*, *Chem. Eur. J.*, **13**(10): 2966–2973 (2007)
- [383] L. Moroder, *Zur Bildung der Tripelhelix durch Selbstassoziation wurde die Lösung eine Nacht lang bei 7 ° bis 8 ° aufbewahrt.*, persönliche Mitteilung (2009)
- [384] Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane und M. Goodman, *Acetyl-Terminated and Template-Assembled Collagen-Based Polypeptides Composed of Gly-Pro-Hyp Sequences. 2. Synthesis and Conformational Analysis by Circular Dichroism, Ultra-violet Absorbance, and Optical Rotation*, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**(43): 10351–10358 (1996)

- [385] S. Lindy, T. Sorsa, K. Suomalainen, A. Lauhio und H. Turto, *Hyperchromic effect of collagen induced by human collagenase*, Eur. J. Biochem., **156**(1): 1–4 (1986)
- [386] G. C. Wood, *Spectral changes accompanying the thermal denaturation of collagen*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **13**(2): 95–99 (1963)
- [387] G. Felsenfeld und G. Sandeen, *The dispersion of the hyperchromic effect in thermally induced transitions of nucleic acids*, J. Mol. Biol., **5**(6): 587–610 (1962)
- [388] D. E. Jensen, R. C. Kelly und P. H. von Hippel, *DNA "melting" proteins. II. Effects of bacteriophage T4 gene 32-protein binding on the conformation and stability of nucleic acid structures.*, J. Biol. Chem., **251**(22): 7215–7228 (1976)
- [389] F. O. Libnau, A. A. Christy und O. M. Kvalheim, *Determination of the Equilibrium Constant and Resolution of the HOD Spectrum by Alternating Least-Squares and Infrared Analysis*, Appl. Spectrosc., **49**: 1431–1437 (1995)
- [390] E. T. J. Nibbering und T. Elsaesser, *Ultrafast Vibrational Dynamics of Hydrogen Bonds in the Condensed Phase*, Chem. Rev., **104**(4): 1887–1914 (2004)
- [391] K. A. Oberg, J. M. Ruyschaert und E. Goormaghtigh, *The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra*, Eur. J. Biochem, **271**: 2937–2948 (2004)
- [392] N. Johnston und S. Krimm, *An infrared study of unordered poly-L-proline in CaCl₂ solutions*, Biopolymers, **10**(12): 2597–2605 (1971)
- [393] D. S. Caswell und T. G. Spiro, *Proline signals in ultraviolet resonance Raman spectra of proteins: cis-trans isomerism in polyproline and ribonuclease A*, J. Am. Chem. Soc., **109**(9): 2796–2800 (1987)
- [394] K. J. Rothschild, Y. W. He, D. Gray, P. D. Roepe, S. L. Pelletier, R. S. Brown und J. Herzfeld, *Fourier transform infrared evidence for proline structural changes during the bacteriorhodopsin photocycle*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**(24): 9832–9835 (1989)
- [395] K. Gerwert, B. Hess und M. Engelhard, *Proline residues undergo structural changes during proton pumping in bacteriorhodopsin*, FEBS Lett., **261**(2): 449–454 (1990)
- [396] A. Herlinger und d. Long, T.V., *Laser-Raman and infrared spectra of amino acids and their metal complexes. 3. Proline and bisprolinato complexes*, J. Am. Chem. Soc., **92**: 6481–6486 (1970)
- [397] N. B. Colthup, S. E. Wiberley und L. H. Daly, *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, Academic Press, New York, 2 Auflage (1975)

- [398] A. George und A. Veis, *FTIRS in water demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro*, *Biochemistry*, **30**(9): 2372–2377 (1991)
- [399] M. Jackson, L.-P. Choo, P. H. Watson, W. C. Halliday und H. H. Mantsch, *Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues*, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.*, **1270**(1): 1–6 (1995)
- [400] Y. A. Lazarev, A. V. Lazareva, V. A. Shibnev und N. G. Esipova, *Infrared spectra and structure of synthetic polytripeptides*, *Biopolymers*, **17**(5): 1197–1214 (1978)
- [401] A. Barth, *Fine-structure enhancement - assessment of a simple method to resolve overlapping bands in spectra*, *Spectrochim. Acta, Part A*, **56**(6): 1223–1232 (2000)
- [402] K. J. Payne und A. Veis, *Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies*, *Biopolymers*, **27**(11): 1749–1760 (1988)
- [403] M. A. Bryan, J. W. Brauner, G. Anderle, C. R. Flach, B. Brodsky und R. Mendelsohn, *FTIR Studies of Collagen Model Peptides: Complementary Experimental and Simulation Approaches to Conformation and Unfolding*, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(25): 7877–7884 (2007)
- [404] Y. A. Lazarev, B. A. Grishkovsky und T. B. Khromova, *Amide I band of IR spectrum and structure of collagen and related polypeptides*, *Biopolymers*, **24**(8): 1449–1478 (1985)
- [405] A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick und B. Brodsky, *Amino Acid Propensities for the Collagen Triple-Helix*, *Biochemistry*, **39**(48): 14960–14967 (2000)
- [406] Y. Xu, T. Hyde, X. Wang, M. Bhate, B. Brodsky und J. Baum, *NMR and CD Spectroscopy Show that Imino Acid Restriction of the Unfolded State Leads to Efficient Folding*, *Biochemistry*, **42**(29): 8696–8703 (2003)
- [407] A. V. Persikov, Y. Xu und B. Brodsky, *Equilibrium thermal transitions of collagen model peptides.*, *Protein Sci.*, **13**(4): 893–902 (2004)
- [408] B. Brodsky, G. Thiagarajan, B. Madhan und K. Kar, *Triple-helical peptides: An approach to collagen conformation, stability, and self-association*, *Biopolymers*, **89**(5): 345–353 (2008)

Danksagung

Wenn einer, der mit Mühe kaum
Gekrochen ist auf einen Baum,
Schon meint, dass er ein Vogel wär,
So irrt sich der.

(Wilhelm Busch)

Ohne die Unterstützung meiner vielen Freunde und Kollegen hätte ich die vorliegende Arbeit niemals fertigstellen können und die vergangenen Jahre hätten mir auch wesentlich weniger Freude gemacht. Daher ist es mir ein Bedürfnis, mich bei denen zu bedanken, die mich währenddessen begleitet, in schwierigen Zeiten getragen aber auch manches Mal wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt haben. Ich werde Euch immer im Gedächtnis behalten. Im Einzelnen haben zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen:

Mein Chef und Doktorvater, Prof. Josef Wachtveitl, gab mir die Möglichkeit, die fs-Infrarotmessanlage (IRMA) aufzubauen und zu optimieren. Auch wenn es mal wieder etwas länger dauerte und manche technische Widrigkeit auszuräumen war, konnte ich stets auf Verständnis und Unterstützung bauen und mich mit der Erprobung eigener Ideen weiterentwickeln. So hat die Arbeit im Labor viel Spaß gemacht und ich konnte einiges dazulernen. Außerdem gebührt ihm Dank für das stete Interesse an den Daten und seine Diskussionsbereitschaft – auch wenn wir nicht immer einer Meinung waren. Seine freundliche und soziale Art haben das hervorragende Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe erst ermöglicht.

Für das Korrekturlesen dieses Werkes geht mein Dank an Mirka-Kristin Verhoefen, Heike Staudt, PD Markus Braun und Julia Herz. Außerdem danke ich Prof. Bernd Brutschy für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für meine doch recht umfangreiche Dissertation zu übernehmen.

In meiner Anfangszeit in Frankfurt waren es vor allem Dr. Martin O. Lenz und Thomas Köhler, die mir alles zeigten, was ich wissen musste und mir oft zur Seite standen. Ohne Ihre Hilfe wäre vieles ungleich schwerer gewesen. Besten Dank.

Beim experimentellen Aufbau haben mich viele Kurzzeit-Infrarot-Experten unterstützt. Für die vielen Tipps und Hilfestellungen am Anfang bedanke ich mich herzlich bei Prof. Peter Hamm und Prof. Jens Bredenbeck. Auch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Zinth in München haben mir weitergeholfen. An dieser Stelle sei besonders Dr. Tobias E. Schrader und Dr. Wolfgang Schreier für manches kompetente und freundschaftliche Gespräch gedankt.

Erst die vielen Spezial- und Sonderanfertigungen aus der Feinmechanikwerkstatt des Institutes haben die Herstellung der experimentellen Apparatur ermöglicht. Die Werkstattleiter, Herr Helmut Jäger und Herr Herbert Ott, waren immer bereit, sich meiner zum Teil ungenauen Vorstellungen oder Skizzen anzunehmen und daraus funktionierende Mechaniken zu entwickeln. Ihnen und allen Mitarbeitern der Werkstatt danke ich für die exzellente Zusammenarbeit und die vielen, hochwertigen Einzelanfertigungen.

Bei Elektrik- und Elektronikproblemen konnte ich mich stets an Herrn Martin Engels (AK Brutschy) und Herrn Bernhardt Thiem (AK Prisner) wenden, die mir immer mit Rat und Tat sowie manch kleinerem Bauteil weitergeholfen haben. Herzlichen Dank dafür.

Prof. Clemens Glaubitz und Ingrid Weber danke ich für die Herstellung der Proteorhodopsin-Proben in außerordentlicher Qualität und Menge sowie für das Interesse an den damit erzielten Ergebnissen. Dank der hervorragenden und unkomplizierten Zusammenarbeit waren die Messungen kein Problem – zumindest von der Probenseite.

Bei den Nitrophenylacetaten hat sich eine sehr gute Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Werner Mäntele ergeben. Dr. Georg Wille gab mit seiner Idee, Nitrophenylacetat als *caged compound* für CO₂ einzusetzen, letztlich den Anstoß zur Untersuchung dieser Proben. Dr. Gabriela Schäfer führte die Rapid-Scan-FTIR-Messungen durch und half bei der Probenpräparation. Prof. Andreas Dreuw und Jan Mewes haben mit der theoretischen Modellierung der Nitrophenylacetate einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Daten geliefert. Ihnen allen danke ich herzlich für die Kooperationsbereitschaft und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Beim Azocollagenprojekt sei zuerst Dr. Ulrike Kusebauch und Prof. Luis Moroder gedankt, die den Azoschalter und das Azocollagen hergestellt hatten. Prof. Luis Moroder war zudem ein jederzeit interessierter, kompetenter und offener Diskussionspartner, was sich als sehr fruchtbar erwiesen hat. Für die Auswertung der hier durchgeführten Messungen waren zudem die von Dr. Lisa Lorenz aufgenommenen und zur Verfügung gestellten Daten unverzichtbar. Außerdem danke ich ihr für die gute Zusammenarbeit im Labor bei verschiedenen Projekten und viele Tipps und Diskussionen beim Azo. PD Markus Braun hat die quantenchemischen Rechnungen zum Azoschalter durchgeführt und mit vielen wertvollen Hinweisen und Diskussionen nicht nur dieses Projekt bereichert. Danke schön.

Für die ganz hervorragende Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich vor allem bei meinen Kolleginnen Heike Staudt und Mirka-Kristin Verhoefen bedanken, die mich vor, während und nach den Messungen in manch langer Nacht und auch am Wochenende oft tatkräftig unterstützt haben. Heike Staudt hat zudem den Bau und die Tests der temperierbaren Küvettenhalterung übernommen und bei vielen Azo-Messungen und den anschließenden Diskussionen über ihre Interpretation mitgewirkt. Mirka-Kristin Verhoefen war eigentlich in alle Projekt involviert und hat mit ihrer zielorientierten und strukturierten Arbeitsweise ebenso zu deren Abschluss beigetragen, wie durch ihre Übersicht in allen probenspezifischen Fragen oder solchen der Infrarotspektroskopie.

Für die schöne Zeit und manches interessante Gespräch, nicht nur im Praktikum für Physikalische Chemie möchte ich mich bei Dr. Peter Pickel und den übrigen Assistenten bedanken. Ich habe in dieser Zeit viel von und mit Euch gelernt und das hat sehr viel Freude bereitet.

Dr. Rainer Hegger konnte mir nicht nur in Computer- und Druckerfragen immer weiterhelfen. Ihm sei zudem für seine ruhige und trotzdem erfrischende Art und die ständige Geduld und Hilfsbereitschaft herzlich gedankt.

Neben der wissenschaftlichen Arbeit gab es auch einiges an administrativen Aufgaben abzuarbeiten. Für die Hilfe bei der Beschaffung von Büromaterial oder anderen Kleinigkeiten sowie bei all den Verträgen, Formularen und sonstigem Papierkram gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen des Sekretariats, Frau Claudia von Sulecki, Frau Kirstin Grönitz und Frau Ute Lorenz.

Für besondere Freundschaft, private Gespräche und moralische Unterstützung und Rückhalt in den letzten Jahren bin ich vor allem Heike Staudt, Nina Gildenhoff und Julia Herz sowie meinem ehemaligen Mitbewohner verbunden, die alle stets Verständnis zeigten und mir nicht nur mit Süßigkeiten oft über den Berg geholfen haben.

Viele ehemalige und jetzige Kollegen haben auf verschiedene Weisen zum Gelingen dieser Arbeit oder zumindest zum tollen Arbeitsklima beigetragen. Daher danke ich ihnen allen für Kuchen und Gespräche und manch andere Begebenheit. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien hier genannt: Sepp, Martin, Thomas, Peter P., Mirka, Heike, Nina, Lisa, Ute, Lars, Julia, Markus, Frank, Peter T., Jörg, Elena, Birgit, Rainer, Maja, Andreas, Michael, Jan-Hendrik, Jürgen, Philipp, Stefan K., Dirk, Jan, Carsten, Gabi, Georg, Stephan R. . . .

Die Arbeit ist ja bekanntlich nicht alles. Deswegen möchte ich auch meine Kameradinnen und Kameraden der Freiwilligen Feuerwehr Bommersheim erwähnen, die mich in ihre Mitte aufgenommen und mir so eine zweite Heimat gegeben haben. Mit ihnen würde ich jederzeit wieder in den Einsatz gehen und ich wünsche, dass sie auch in Zukunft immer gesund und heil von dort zurückkommen. Ich bedanke mich für die schöne Zeit, die ich mit ihnen, ihren Angehörigen und meinen übrigen Freunden hier verbringen durfte.

Bevor ich nach Bommersheim kam waren Paula Hardt und Cornelia Bosse so nett mich einige Wochen bei sich aufzunehmen. Seitdem bin ich auch ihnen freundschaftlich verbunden, auch wenn die Besuche in letzter Zeit selten waren. Vielen Dank für die Unterkunft, die vielen schönen Tage und dass Ihr so oft an mich gedacht habt.

Einen ganz besonderen Platz hat meine Freundin und Kollegin Mirka-Kristin Verhoefen in meinem Leben und in meinem Herzen eingenommen. Sie konnte mit unendlicher Geduld im Labor mit mir zusammenarbeiten, hat manche Dinge in stressigen Zeiten geordnet und fand in jeder Situation die richtigen Worte. So war sie erst Kollegin und wurde Kumpel, Freundin, Kummertante und Vorbild. Als sie mir zeigte, dass sie noch beharrlicher sein kann als ich, war es dann geschehen, sie wurde zu meiner Partnerin . . . und das ist auch gut so.

Mirka, Du hast gerade in letzter Zeit so viel für mich und das Gelingen dieser Arbeit getan, du hast mir vertraut, mich unterstützt, gepflegt und aufgebaut. Was soll ich da noch sagen. Herzlichen Dank, mein Schatz! Ich bin sehr froh, dass es Dich gibt.

Zuletzt möchte ich meiner Familie aufs Herzlichste danken. Auf ihre Hilfe und ihren Rückhalt konnte ich jederzeit blind vertrauen und das war für mich sehr wichtig. Meine Eltern haben mich über viele Jahre unterstützt und mir ein Zuhause, Liebe und Geborgenheit gegeben. Sie lebten mir vor, worauf es ankommt und gaben mir Wertvorstellungen und Moral. Kurz – sie machten mich zu dem, der ich bin. Mein Bruder Andreas hat nicht nur ständig meine Autos repariert und mich immer vortrefflich in der Finka aufgenommen, sondern war durch seine Verlässlichkeit und seinen Fleiß immer auch ein Vorbild. Meine *kleine* Schwester Claudia hat mein Leben auch in vielerlei Hinsicht bereichert – z. B. wären wir ohne sie wohl nie zu Tyson gekommen. Und darauf möchte ich nun wirklich nicht verzichten. An dieser Stelle möchte ich auch an meinen geliebten Opa August Henning erinnern. Ich habe nie einen Menschen gekannt, der fleißiger, selbstloser und liebevoller gewesen wäre. Danke, dass Du für mich da und in so vielen Dingen mein Vorbild warst. Wie gerne hätte ich Dir diese Arbeit noch gezeigt . . .

Vielen herzlichen Dank an alle genannten Personen – und an die Vergessenen.
Ohne Euch wäre mein Leben sicher anders aber kaum schöner verlaufen.
Tauschen möchte ich jedenfalls um nichts auf der Welt!