

**Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen an
Flavoproteinen: Photoprotektion von Flavinen in
Dodecinen und erste Schritte der Peptidfaltung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Heike Staudt
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2012
D30

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

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Dekan | Prof. Dr. Thomas Prisner |
| 1. Gutachter | Prof. Dr. Josef Wachtveitl |
| 2. Gutachter | Prof. Dr. Martin Grininger |
| Datum der Disputation | 09.10.2012 |

„Denn Zeit ist Leben. Und das Leben wohnt im Herzen.“

(Michael Ende, aus „Momo“)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Grundlagen und experimentelle Techniken | 5 |
| 2.1 | Spektroskopische Methoden | 5 |
| 2.1.1 | Spektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich | 6 |
| 2.1.2 | Spektroskopie im infraroten Spektralbereich | 8 |
| 2.2 | Ultrakurzzeitspektroskopie | 14 |
| 2.2.1 | Nichtlineare Optik | 15 |
| 2.2.2 | Erzeugung ultrakurzer Laserpulse | 18 |
| 2.3 | Experimentelle Aufbauten | 19 |
| 2.3.1 | Wellenlängenkonversion | 21 |
| 2.3.2 | Anisotropie in transienten Absorptionsspektren | 26 |
| 2.3.3 | Transiente Absorption im UV/vis | 27 |
| 2.3.4 | Transiente Absorption im mittleren Infraroten | 30 |
| 2.3.5 | Datenauswertung | 36 |
| 3 | Flavine und Flavoproteine | 39 |
| 3.1 | Flavine | 39 |
| 3.2 | Flavoproteine | 43 |
| 4 | Dodecin | 45 |
| 4.1 | Einführung | 45 |
| 4.1.1 | Dodecin aus <i>Halobacterium salinarum</i> | 45 |
| 4.1.2 | Dodecine aus anderen Organismen | 49 |
| 4.2 | Motivation: Aufklärung des Reaktionsmechanismus | 50 |
| 4.3 | Experimentelle Vorgehensweise | 52 |
| 4.4 | Ergebnisse | 53 |
| 4.4.1 | Dodecin aus <i>Halobacterium salinarum</i> mit Riboflavin | 53 |
| 4.4.2 | HsDod mit Lumiflavin | 69 |
| 4.4.3 | HsDod mit FAD | 73 |
| 4.4.4 | HsDod mit Riboflavin und Lumichrom | 78 |
| 4.4.5 | HsDod: D41-Mutanten | 89 |
| 4.4.6 | HsDod mit Riboflavin in D ₂ O-Pufferlösung | 92 |
| 4.4.7 | HsDod mit Tryptophan-Derivaten | 97 |
| 4.4.8 | Dodecin aus <i>Halorhodospira halophila</i> mit Riboflavin | 109 |
| 4.5 | Fazit | 115 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5 | Azo peptide | 121 |
| 5.1 | Einführung | 121 |
| 5.1.1 | Erste Schritte der Proteinfaltung | 121 |
| 5.1.2 | Das Flavoprotein Thioredoxinreduktase | 121 |
| 5.1.3 | Der Photoschalter Azobenzol | 123 |
| 5.1.4 | Design der eingesetzten Azo peptide | 129 |
| 5.2 | Experimentelle Vorgehensweise | 133 |
| 5.3 | Ergebnisse | 134 |
| 5.3.1 | Statische Charakterisierung | 134 |
| 5.3.2 | Transiente Absorptionsspektroskopie im mittleren infraroten Spektralbereich | 138 |
| 5.3.3 | Diskussion | 146 |
| 6 | Zusammenfassung | 149 |
| 6.1 | Deutsche Fassung | 149 |
| 6.2 | English Version | 151 |
| | Literaturverzeichnis | 153 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 2.1 | Jablonski-Diagramm | 7 |
| 2.2 | Schema eines Anreg-Abtast-Experiments | 14 |
| 2.3 | Schema eines nichtkollinear optisch parametrischen Verstärkers | 23 |
| 2.4 | Schema eines Prismenkompressors | 24 |
| 2.5 | Schema der IR-Erzeugung | 25 |
| 2.6 | Pulszug für transiente Messungen im UV/vis | 28 |
| 2.7 | Lampenspektrum für die kontinuierliche Belichtung | 33 |
| 2.8 | Gestörter freier Induktionszerfall | 35 |
| 2.9 | Kreuzkorrelationssignale | 36 |
| 3.1 | Struktur der Flavine | 39 |
| 3.2 | Struktur des Lumichroms | 40 |
| 3.3 | UV/vis-Absorptionsspektrum von Riboflavin | 40 |
| 3.4 | Oxidationszustände der Flavine | 41 |
| 3.5 | Photochemie des Riboflavins | 42 |
| 4.1 | Struktur des archaealen Dodecins (HsDod) | 46 |
| 4.2 | Wasserkoordiniertes Magnesiumion unterhalb der Bindetasche | 47 |
| 4.3 | Unterschiedliche Position von Riboflavin und Lumiflavin in HsDod | 48 |
| 4.4 | Bindetasche von HsDod mit FAD | 49 |
| 4.5 | Vergleich der Bindetaschen von HsDod und HhDod | 50 |
| 4.6 | HsDod-gebundenes Riboflavin: UV/vis-Absorptionsspektrum | 54 |
| 4.7 | Riboflavin in Lösung und eingebaut in HsDod: transiente Spektren | 56 |
| 4.8 | Riboflavin in Lösung und eingebaut in HsDod: transiente Absorptionsänderungen | 57 |
| 4.9 | HsDod-gebundenes Riboflavin: Vergleich der Dynamik bei einzelnen Wellenlängen | 58 |
| 4.10 | HsDod-gebundenes Riboflavin: transiente Absorptionsänderungen bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen | 59 |
| 4.11 | HsDod-gebundenes Riboflavin: transiente Absorptionsänderungen bei unterschiedlichen Anregungsintensitäten | 60 |
| 4.12 | HsDod-gebundenes Riboflavin: Zerfallasoziierte Spektren | 61 |
| 4.13 | Schema zum Elektronentransfer in HsDod | 62 |
| 4.14 | Schema zum Elektronentransfer nach der Marcus-Theorie | 63 |
| 4.15 | Modellmechanismus parallel und sequentiell | 65 |
| 4.16 | Gauß-Fit an das DAS von τ_2 von HsDod-gebundenem Riboflavin | 65 |

| | |
|--|-----|
| 4.17 HsDod-gebundenes Riboflavin: Transiente Absorptionsänderungen bei 507 nm, Anteile der einzelnen Zeitkonstanten | 66 |
| 4.18 HsDod-gebundenes Riboflavin: Bathochrom verschobenes UV/vis-Absorptionsspektrum im Vergleich zum zerfallassozierten Spektrum von τ_3 | 69 |
| 4.19 HsDod-gebundenes Lumiflavin: UV/vis-Absorptionsspektrum | 70 |
| 4.20 Lumiflavin in Lösung und eingebaut in HsDod: Transiente Spektren . . | 71 |
| 4.21 HsDod-gebundenes Lumiflavin: Transiente Absorptionsänderungen . . . | 72 |
| 4.22 HsDod-gebundenes FAD: UV/vis-Absorptionsspektrum | 74 |
| 4.23 FAD in Lösung und eingebaut in HsDod: Transiente Spektren | 75 |
| 4.24 HsDod-gebundenes FAD: Transiente Absorptionsänderungen | 76 |
| 4.25 HsDod-gebundenes FAD: Zerfallassozierte Spektren | 77 |
| 4.26 HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom: UV/vis-Absorptionsspektrum | 79 |
| 4.27 HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom: Transiente Spektren . . | 80 |
| 4.28 HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom bei 475 nm-Anregung: Transiente Absorptionsänderungen | 81 |
| 4.29 HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom bei 388 nm-Anregung: Transiente Absorptionsänderungen | 82 |
| 4.30 HsDod-gebundenes Lumichrom: Transienten bei verschiedenen Anregungswellenlängen | 82 |
| 4.31 HsDod-gebundenes Lumichrom und Riboflavin: Transienten bei verschiedenen Anregungswellenlängen | 83 |
| 4.32 HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom: Zerfallassozierte Spektren | 86 |
| 4.33 Mutation D41E und D41S | 89 |
| 4.34 D41E- und D41S-HsDod-Mutante: UV/vis-Absorptionsspektrum | 90 |
| 4.35 D41E- und D41S-HsDod: Transiente Absorptionsänderungen | 91 |
| 4.36 HsDod-gebundenes Riboflavin in H ₂ O und D ₂ O: UV/vis-Absorptionsspektrum | 93 |
| 4.37 HsDod-gebundenes Riboflavin in H ₂ O und D ₂ O: Transiente Spektren . . | 93 |
| 4.38 HsDod-gebundenes Riboflavin in H ₂ O und D ₂ O: Transiente Absorptionsänderungen | 94 |
| 4.39 HsDod-gebundenes Riboflavin in H ₂ O und D ₂ O: Zerfallassozierte Spektren | 95 |
| 4.40 Struktur der eingesetzten Tryptophan-Derivate | 98 |
| 4.41 HsDod-W-Analoga: UV/vis-Absorptionsspektren | 99 |
| 4.42 HsDod-W-Analoga: Farbe der Proben | 100 |
| 4.43 HsDod-W-Analoga: Transiente Spektren | 101 |
| 4.44 HsDod-W-Analoga: Transiente Absorptionsänderungen | 102 |
| 4.45 HsDod-W-Analoga: Zeitschnitte | 103 |
| 4.46 HsDod-W-Analoga: Zerfallassozierte Spektren | 104 |
| 4.47 HsDod-W-Analoga: Einzelkanal-Fitanalyse im Bereich des Grundzustandsbleichens | 106 |
| 4.48 Schema für den Elektronentransfer für die HsDod-W-Analoga | 108 |

| | | |
|------|---|-----|
| 4.49 | Riboflavin in HsDod und HhDod: UV/vis-Absorptionsspektren | 110 |
| 4.50 | Riboflavin in HsDod und HhDod: Transiente Spektren | 111 |
| 4.51 | Riboflavin in HsDod und HhDod: Transiente Absorptionsänderungen . . | 112 |
| 4.52 | Riboflavin in HsDod und HhDod: Zerfallasoziierte Spektren | 113 |
| 4.53 | Schema des parallelen und sequentiellen Löschungsmechanismus in HsDod | 116 |
| 4.54 | Schema eines möglichen Löschungsmechanismus mit anschließenden Kühl- prozessen | 118 |
| 5.1 | Struktur der Thioredoxinreduktase | 122 |
| 5.2 | Struktur von <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Azobenzol | 123 |
| 5.3 | Absorptionsspektren von <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Azobenzol | 124 |
| 5.4 | Reaktionspfade der Azobenzolisomerisierung | 126 |
| 5.5 | Photoschalter APB und AMPB | 129 |
| 5.6 | Entwicklungsprozess der bizyklischen Azopeptide | 131 |
| 5.7 | <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Struktur des bizyklischen wasserlöslichen Azopeptids . . . | 132 |
| 5.8 | <i>cis</i> - und <i>trans</i> -bcAMPB(H ₂ O): UV/vis-Absorptionsspektren | 134 |
| 5.9 | bcAMPB(H ₂ O): FTIR-Spektren | 135 |
| 5.10 | bcAMPB(H ₂ O): Feinstrukturverstärkung der FTIR-Spektren | 136 |
| 5.11 | bcAMPB(H ₂ O): Transientes IR-Spektrum | 139 |
| 5.12 | bcAMPB(H ₂ O): Zeitschnitte | 140 |
| 5.13 | bcAMPB(H ₂ O): Transiente Absorptionsänderungen | 141 |
| 5.14 | bcAMPB(H ₂ O): Photodegradation | 142 |
| 5.15 | bcAMPB(H ₂ O): Zerfallasoziierte Spektren | 143 |
| 5.16 | bcAMPB(H ₂ O): Anisotropie | 145 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| 4-Amino-W-HsDod | Dodecin aus <i>Halobacterium salinarum</i> mit 4-Amino-Tryptophan-Derivat |
| 4-Aza-W-HsDod | Dodecin aus <i>Halobacterium salinarum</i> mit 4-Aza-Tryptophan-Derivat |
| 4-Fluoro-W-HsDod | Dodecin aus <i>Halobacterium salinarum</i> mit 4-Fluoro-Tryptophan-Derivat |
| AMPB | 4(4'- A minomethylphenylazo) b enzoessäure |
| APB | 4(4'- A minophenylazo) b enzoessäure |
| ATR | Abgeschwächte Totalreflexion (engl. a ttenuated t otal r eflection) |
| BBO | β - B arium b orat |
| bcAMPB | Bizyklisches Peptid mit dem AMPB-Photoschalter, (H ₂ O) bzw. (DMSO) beziehen sich auf das Lösungsmittel, in dem das Peptid löslich ist |
| BLUF-Domäne | Blaulichtrezeptor, der FAD als Chromophor nutzt (b lue l ight s ensing u sing F AD) |
| CPA | engl. c hirped p ulse a mplification |
| CT | Ladungstransfer (engl. c harge t ransfer) |
| DAS | Zerfallassoziertes Spektrum (engl. d ecay a ssociated s pectrum) |
| DFG | Differenzfrequenzerzeugung (engl. d ifference f requency g eneration) |
| EmoB | NADH:FMN Oxidoreductase |
| DMSO | D imethylsulfoxid |
| ET | E lektronentransfer |
| FAD | F lavin a denin d inucleotid |
| FID | freier Induktionszerfall (engl. f ree i nduction d ecay) |
| FIST | LabView basiertes Auswertungsprogramm für transiente Messungen im IR (engl. f emtosecond i nfrared s pectroscopy t oolkit) |
| FMN | F lavin m ononucleotid |
| FO-TrxR | F lavin o xidationskonformation der T hioredoxinreduktase |
| FR-TrxR | F lavin r eduktionskonformation der T hioredoxinreduktase |

| | |
|------------|--|
| FTIR | F ourier- T ransformation- I nfrarot |
| HhDod | Dodecin aus <i>Halorhodospira halophila</i> |
| HsDod | Dodecin aus <i>Halobacterium salinarum</i> |
| H-TrxR | <i>high molecular weight</i> T hioredoxinreduktase |
| IC | innere Umwandlung (engl. i nternal c onversion) |
| IRMA | I nfrarot m ess a n l a g e |
| ISC | Interkombinationsübergang (engl. i ntersystem c rossing) |
| IS | Zwischenprodukt (engl. i ntermediate s tate) |
| KTP | (K alium t itanyl p hosphat) |
| Lc | L umichrom |
| L-TrxR | <i>low molecular weight</i> T hioredoxinreduktase |
| LOV-Domäne | Blaulichtrezeptor, der FMN als Chromophor nutzt (engl. l ight o x y gen v oltage) |
| MD | Molekulardynamik (engl. m olecular d ynamic) |
| MWCO | engl. m olecular w eight c ut o ff |
| NADH | N icotin a mid a denin d inukleotid |
| NADPH | N icotin a mid a denin d inukleotid p hosphat |
| Nd:YAG | N eodym-dotierter Y ttrium- A luminium- G ranat |
| NOPA | Nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker (engl. n oncollinear o ptical p arametric a mplifier) |
| OPA | Optisch parametrischer Verstärker (engl. o ptical p arametric a mplifier) |
| PDB | Proteindatenbank (engl. p rotein d atabank) |
| PFID | gestörter freier Induktionszerfall (engl. p erturbed f ree i nduction d ecay) |
| PT | P rotonentransfer |
| Rf | R iboflavin |
| RfbP | R iboflavin b inde p rotein |
| SFG | Summenfrequenzzeugung (engl. s um f requency g eneration) |
| SHG | Frequenzverdopplung (engl. s econd h armonic g eneration) |
| SPI | engl. selective p ressure i ncorporation |
| TRIS | T ris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Trx | T hioredoxin |
| TrxR | T hioredoxinreduktase |
| UV | ultravioletter Spektralbereich |
| vis | sichtbarer Spektralbereich |
| VR | Schwingungsrelaxation (engl. v ibrational r elaxation) |
| wt | W ildtyp |
| XPM | Kreuzphasenmodulation (engl. c ross p hase m odulation) |

Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren

| | |
|---|----------------|
| A | Alanin |
| C | Cystein |
| D | Asparaginsäure |
| E | Glutaminsäure |
| F | Phenylalanin |
| G | Glycin |
| H | Histidin |
| I | Isoleucin |
| K | Lysin |
| L | Leucin |
| M | Methionin |
| N | Asparagin |
| P | Prolin |
| Q | Glutamin |
| R | Arginin |
| S | Serin |
| T | Threonin |
| V | Valin |
| W | Tryptophan |
| Y | Tyrosin |

1 Einleitung

Flavine können in verschiedenen Oxidations- und Protonierungszuständen vorliegen. Außerdem besitzen sie die Eigenschaft, Licht im blauen und ultravioletten Spektralbereich zu absorbieren. Die enorme Bandbreite an möglichen Zuständen macht sie zu wichtigen Cofaktoren in einer Reihe von Flavoproteinen. Dort fungieren sie als Überträger von ein oder zwei Elektronen in verschiedenen Redoxreaktionen, sowie als Chromophor in Blaulichtrezeptoren. Ihre katalytischen Eigenschaften werden dabei von der Proteinumgebung kontrolliert, indem einzelne Zustände der Flavine stabilisiert oder destabilisiert werden. Riboflavin (Vitamin B2) spielt als Cofaktor in solchen Proteinen eine untergeordnete Rolle, die meisten Flavoproteine enthalten für ihre katalytische Funktion Flavinmononucleotid (FMN) oder Flavinadenindinucleotid (FAD). Riboflavin spielt jedoch als Grundbaustein in der Biosynthese dieser beiden größeren Flavine eine bedeutende Rolle. Pflanzen und viele Mikroorganismen sind in der Lage Riboflavin selbst aus Purin-Vorstufen zu synthetisieren, Tiere und Menschen müssen es jedoch über die Nahrung aufnehmen [1]. Da Riboflavin lichtempfindlich ist, haben einige Organismen Proteine entwickelt, deren Aufgabe das Binden von Riboflavinmolekülen und deren Bewahrung vor Photodegradation ist, die sogenannten Riboflavinbindepoteine (RfbP) [2–4]. Zudem verhindern diese Proteine unerwünschte Reaktionen des Riboflavins und die Bildung zelltoxischer Abbauprodukte wie Lumichrom. Die Funktion der Proteine ist hierbei, neben einer Abschirmung des Riboflavins von der Umgebung, eine schnelle Entvölkerung des reaktiven elektronisch angeregten Zustands nach Photoanregung.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Dodecin-Protein aus *Halobacterium salinarum* (HsDod) handelt es sich um ein solches RfbP. Frühere Studien zeigen, dass sich durch den Einbau von Riboflavin in HsDod dessen Lebensdauer unter Lichteinwirkung um das 200fache verlängert [5]. Weiterhin wird die Fluoreszenz des Riboflavins unterdrückt. Die Struktur des archaealen Dodecins konnte 2003 mittels Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden [6]. Eine Besonderheit des Dodecins ist das Binden von Flavindimeren in jeder seiner sechs identischen Bindetaschen, während andere RfbP nur ein Flavin pro Bindetasche einbauen können. Diese bemerkenswerte Eigenschaft macht Dodecin zu einem interessanten Studienobjekt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung des Mechanismus, der zu einer erhöhten Lebensdauer des HsDod-gebundenen Riboflavins führt. Da eine schnelle Entvölkerung des elektronisch angeregten Zustands des Flavins durch die Proteinumgebung vermutet wird, werden zeitaufgelöste spektroskopische Methoden für die Untersuchungen mit einer Zeitauflösung im Bereich von wenigen hundert Femtosekunden eingesetzt. Transiente Spektroskopie im UV/vis-Spektralbereich erlaubt hierbei die Betrachtung der Dynamik des Riboflavins nach Photoanregung. Des Weiteren werden Unterschiede

zwischen archaealen und bakteriellen Dodecin-Proteinen untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die lichtinduzierte Konformationsänderung von Modellpeptiden. Die Funktion eines Proteins hängt von der Struktur und der Anordnung der unterschiedlichen Aminosäurereste ab. Die Struktur von Proteinen ist häufig sehr komplex und wird bestimmt durch ihre Aminosäuresequenz. Jedes Protein wird in der Zelle zunächst in dem Prozess der Translation als lange Kette synthetisiert, bestehend aus Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Durch Proteinfaltung bilden sich aus dieser eher zufälligen Anordnung Sekundär- und Tertiärstrukturen aus, die letztendlich zu der Struktur des funktionsfähigen Proteins führen. Diese Prozesse laufen auf Zeitskalen von Sekunden bis Minuten ab. Die ersten Schritte, die für eine Faltung des Peptids notwendig sind, finden jedoch auf deutlich kürzeren Zeitskalen statt. Die Bewegung der einzelnen Peptid- und Seitengruppen können bereits auf einer Pikosekunden-Zeitskala beobachtet werden. Die Infrarotspektroskopie stellt ein Mittel zur Beobachtung von strukturellen Veränderungen im Peptidrückgrat dar. Für die Betrachtung von Prozessen, die auf Femto- bis Pikosekunden-Zeitskalen ablaufen, muss dem Peptid ein kurzes Startsignal gegeben werden. Photoschaltbare Moleküle, die durch Lichtanregung eine schnelle Strukturveränderung herbeiführen, eignen sich für diese Anforderungen. Besonders etabliert hat sich hierbei Azobenzol, das sich durch Licht verschiedener Wellenlängen zwischen zwei Konformationen reversibel hin und her schalten lässt, wobei die beiden Konformationen unterschiedliche End-zu-End-Abstände aufweisen und diese Konformationsänderung auf eine kurze Peptidsequenz übertragen werden kann.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über den Aufbau dieser Arbeit gegeben werden.

Kapitel 2 bietet zunächst eine kurze Einführung in die theoretischen Grundlagen der verwendeten spektroskopischen Methoden und stellt diese anschließend vor. Es enthält eine grundsätzliche Einführung in Spektroskopie im UV/vis- und Infrarotspektralbereich, in nichtlineare Optik und die Prinzipien der Kurzzeitspektroskopie auf der Basis von Anreg-Abtast-Experimenten. Im Anschluss werden die verwendeten experimentellen Aufbauten vorgestellt.

In *Kapitel 3* werden die Eigenschaften von Flavinen vorgestellt und ihre Bandbreite als Cofaktoren in Flavoproteinen aufgezeigt.

Kapitel 4 führt die in dieser Arbeit untersuchten Dodecin-Proteine ein. Neben der Struktur der archaealen und bakteriellen Dodecine werden die Funktion und die möglichen Cofaktoren vorgestellt. Die experimentelle Vorgehensweise wird erläutert und anschließend werden die Ergebnisse der statischen und transienten spektroskopischen Untersuchungen im UV/vis-Spektralbereich an unterschiedlichen Proben des Dodecins aus dem Archaeaon *Halobacterium salinarum* und an Dodecin aus dem Bakterium *Halorhodospira halophila* gezeigt. Diese Ergebnisse werden diskutiert und schließlich ein Reaktionsmodell für das archaeale Dodecin aufgestellt.

In *Kapitel 5* wird zunächst das bizyklische Azopeptid, das zur Untersuchung der initialen Schritte in der Peptidfaltung herangezogen wurde, eingeführt. Nach der Vorstellung der experimentellen Vorgehensweise werden die Ergebnisse der statischen UV/vis- und FTIR-Spektroskopie, sowie die Ergebnisse der transienten spektroskopischen Untersuchungen im mittleren Infraroten gezeigt und diskutiert.

Kapitel 6 enthält eine Zusammenfassung aller Ergebnisse dieser Arbeit in deutscher und englischer Sprache.

2 Grundlagen und experimentelle Techniken

Im folgenden Kapitel werden zunächst Grundlagen der Spektroskopie erörtert. Die Inhalte hierfür stammen aus den Lehrbüchern [7–10]. Anschließend wird das Prinzip der Ultrakurzzeitspektroskopie vorgestellt. Die Inhalte sind der entsprechenden Fachliteratur entnommen [11–18]. Im Anschluss werden die in dieser Arbeit verwendeten Experimente vorgestellt.

2.1 Spektroskopische Methoden

Absorptionsspektroskopie basiert auf der Absorption eines Lichtquants durch die zu untersuchende Probe. Damit dies geschieht, muss die Energie des Photons einem erlaubten Übergang zwischen einem besetzten und einem unbesetzten Energieniveau des zu untersuchenden Moleküls entsprechen. Die Energie des Photons ist hierbei durch folgende Beziehung mit der Wellenlänge bzw. der Frequenz verknüpft:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (2.1)$$

h ist hierbei das Plancksche Wirkungsquantum und c die Lichtgeschwindigkeit.

Das Lambert-Beersche Gesetz beschreibt die Absorption als negativen Logarithmus des Quotienten der Intensitäten von einfallender (I_0) und austretender Strahlung (I) und ihre Abhängigkeit von Schichtdicke d , Konzentration c und molarem Extinktionskoeffizient ϵ der zu untersuchenden Probe bei der Wellenlänge λ .

$$A(\lambda) = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.2)$$

Je nach Energie der verwendeten Strahlung werden unterschiedliche Übergänge in Molekülen angeregt. Während die Absorption von Strahlung im mittleren infraroten Spektralbereich ($3\ \mu\text{m}$ – $30\ \mu\text{m}$) zu Schwingungs- und Rotationsübergängen führt, werden durch die Absorption von Strahlung im sichtbaren (vis, $400\ \text{nm}$ – $750\ \text{nm}$) und ultravioletten Spektralbereich (UV, $10\ \text{nm}$ – $400\ \text{nm}$) Valenzelektronen angeregt.

2.1.1 Spektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich

Elektronische Übergänge können immer dann stattfinden, wenn das Übergangsdipolmoment μ_{EA} von Null verschieden ist. Es ist definiert als

$$\mu_{EA} = \int \Psi_E^* \mu \Psi_A d\tau, \quad (2.3)$$

wobei μ der elektrische Dipoloperator und Ψ_A, Ψ_E die Wellenfunktionen von Anfangs- und Endzustand sind. Je größer das Übergangsdipolmoment ist, desto größer ist die Kopplung zwischen dem elektronischen Übergang und der elektromagnetischen Strahlung. Das Übergangsdipolmoment ist eine vektorielle Größe, wobei die Übergangswahrscheinlichkeit oder auch Oszillatorstärke des Übergangs proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments $|\mu_{EA}|^2$ ist. Für linear polarisiertes Licht ist die Übergangswahrscheinlichkeit dann am größten, wenn der elektrische Feldvektor und das Übergangsdipolmoment parallel zueinander stehen. Der Übergang findet nach dem Franck-Condon-Prinzip vertikal statt, dies bedeutet, dass sich während des Übergangs des Moleküls in einen elektronisch angeregten Zustand die Position der Atomkerne nicht ändert. Auf der Basis des Satzes von der Erhaltung des Drehimpulses können Auswahlregeln für die erlaubten elektronischen Übergänge formuliert werden. So besagt das Spin-Verbot, dass sich die Multiplizität $M = 2S + 1$, S ist hierbei die Spinquantenzahl, während eines Übergangs nicht ändern darf. Somit ist z. B. ein Übergang von einem Singulett- in einen Triplett-Zustand nicht erlaubt. Des Weiteren sind bei zentro-symmetrischen Molekülen nach der Regel von Laporte Übergänge zwischen Orbitalen mit gleicher Parität untersagt. Hierbei handelt es sich um einen Spezialfall des Symmetrie-Verbots, das Übergänge zwischen Zuständen mit gleicher Symmetrie verbietet. Das sogenannte Überlappungsverbot wird wirksam, wenn, wie z. B. im Falle eines Charge-Transfer-Übergangs, die beim Elektronenübergang beteiligten Orbitale nicht oder nur wenig überlappen.

Elektronenübergänge können mit Hilfe der beteiligten Molekülorbitale klassifiziert werden. Man unterscheidet hierbei bindende σ - und π -, nichtbindende n -, sowie anti-bindende σ^* - und π^* -Orbitale. Entsprechend werden sie als $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ oder $n \rightarrow \pi^*$ bezeichnet. Gruppen eines Moleküls (z. B. Carbonylgruppen) oder ganze Moleküle (z. B. Polyene), die Licht im UV/vis-Spektralbereich absorbieren, bezeichnet man als Chromophore (griech. Farbträger). Die Lage ihrer Absorptionsbanden ist charakteristisch für die betreffende Gruppe, kann jedoch durch sterische, induktive und mesomere Effekte durchaus stark beeinflusst werden. So hat z. B. die Umgebung eines Chromophors, sei es in Form des Lösungsmittels oder der Proteinumgebung, einen charakteristischen Einfluss auf die Lage und Intensität der Absorptionsbanden. Eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen wird als bathochrom, zu kürzeren Wellenlängen als hypsochrom bezeichnet. Eine Intensitätserhöhung bezeichnet man als hyperchromen, eine Intensitätsverringernng als hypochromen Effekt. Bei einem Charge-Transfer-Komplex gehen Elektronen reversibel von einem Donor auf einen Akzeptor über. Dabei können Donor und Akzeptor unterschiedliche Teile eines Moleküls oder zwei unterschiedliche

Moleküle sein. Die Absorptionsbanden eines solchen Komplexes können sich von denen der Einzelkomponenten erheblich unterscheiden.

Deaktivierung elektronisch angeregter Zustände

Nach Photoanregung kann ein Molekül in einem elektronisch angeregten Zustand seine Energie auf unterschiedliche Weise wieder abgeben. Hierbei kann es sich um einen strahlenden oder strahlungslosen Prozess, einen monomolekularen oder bimolekularen Prozess handeln. Die monomolekularen Deaktivierungsprozesse können anhand des Jablonski-Diagramms in Abbildung 2.1 diskutiert werden.

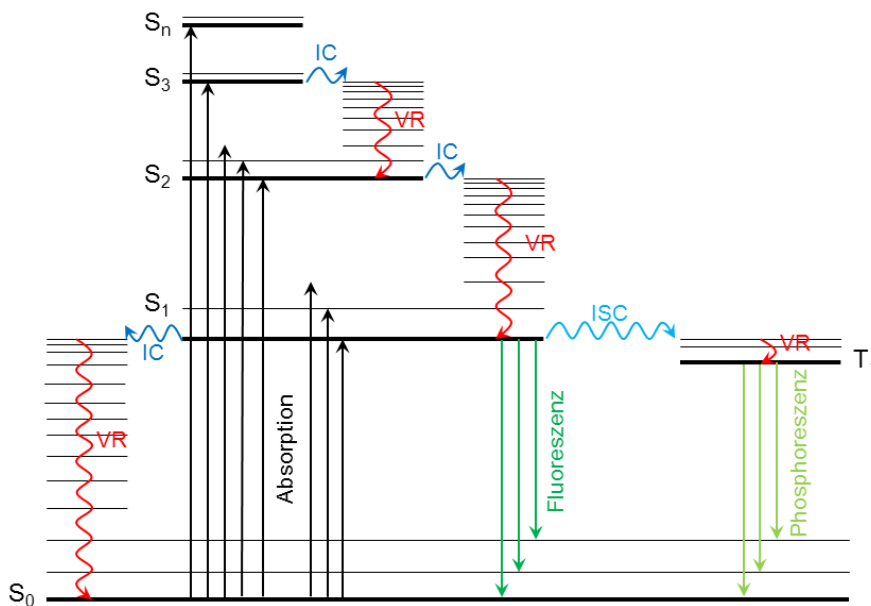


Abbildung 2.1: Das Jablonski-Diagramm zeigt mögliche Prozesse nach Photoanregung. IC: Interne Konversion, ISC: Interkombinationsübergang, VR: Schwingungsrelaxation

Ausgehend vom Singulett-Grundzustand S_0 kann das Molekül durch Absorption eines Photons geeigneter Energie in einen schwingungsangeregten Zustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 oder eines elektronisch höher angeregten Zustands (S_2, S_3, \dots, S_n) übergehen. Die Schwingungsrelaxation (VR, engl. *vibrational relaxation*) in den Schwingungsgrundzustand erfolgt vor allem in Lösung häufig sehr schnell durch Stöße. Dabei wird die Energie in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Durch innere Umwandlung (IC, engl. *internal conversion*,) kann das Molekül von einem höher in einen niedriger angeregten Zustand gelangen und durch Schwingungsrelaxation den Schwingungsgrundzustand erreichen. Außerdem kann das Molekül seine Energie auch in Form von Strahlung wieder abgeben. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Strahlungsemission. Zum einen kann das Molekül aus dem S_1 -Zustand durch Fluoreszenz

in den Grundzustand zurück gelangen. Zum anderen kann das Molekül durch einen strahlungslosen Interkombinationsübergang (ISC, engl. intersystem crossing) in einen angeregten Triplett-Zustand (T_n) übergehen. Von dem ersten angeregten Triplettzustand (T_1) kann das Molekül über Phosphoreszenz in den Singulett-Grundzustand S_0 zurück gelangen. Während der Übergang vom S_1 - in den S_0 -Zustand spinerlaubt ist, ist der $T_1 \rightarrow S_0$ -Übergang spinverboten. Deshalb ist die Emission im ersten Fall deutlich schneller, typische Fluoreszenzlebensdauern liegen im Bereich von einigen Nanosekunden, während Phosphoreszenzlebensdauern deutlich länger sind und im Zeitbereich von Millisekunden bis Sekunden liegen.

Nach Photoanregung in höher angeregte Zustände findet ein schneller strahlungsloser Zerfall in den S_1 -Schwingungsgrundzustand mit einer Geschwindigkeitskonstante in der Größenordnung von 10^{12} s^{-1} statt. Dies ist auch der Grund dafür, weshalb Fluoreszenzspektren typischerweise unabhängig von der Anregungswellenlänge sind. Dieser Effekt wird auch als Kashas Regel bezeichnet [19]. Das Fluoreszenzspektrum ist im Vergleich zum Absorptionsspektrum um den sogenannten Stokes-Shift verschoben und bildet häufig das Spiegelbild zum Absorptionsspektrum. Dieses Phänomen beruht darauf, dass die Schwingungszustände des S_1 -Zustands, die sich in der Feinstruktur des Absorptionsspektrums widerspiegeln, und die Schwingungszustände des Grundzustands, die für die Feinstruktur des Fluoreszenzspektrums verantwortlich sind, sich meist sehr ähnlich sind.

Neben den monomolekularen Deaktivierungsmechanismen existieren eine Reihe von Mechanismen, bei denen weitere Moleküle zur Deaktivierung des elektronisch angeregten Moleküls beitragen. Im Allgemeinen wird hierbei die Anregungsenergie auf ein anderes Molekül übertragen. Wird die Emission des angeregten Moleküls dabei unterdrückt, so spricht man von Strahlungslöschung. Unter diesem Gesichtspunkt können alle chemischen Reaktionen, die unter der Beteiligung von angeregten Zuständen ablaufen als Löschprozesse bezeichnet werden. Hier werden zunächst nur die Prozesse behandelt, die nicht zu neuen chemischen Verbindungen führen. Handelt es sich bei dem als Löscher wirkenden Molekül um ein Molekül der gleichen Sorte, so spricht man von Selbstlöschung (oder Konzentrationslöschung), handelt es sich um ein anderes Molekül, so spricht man von Löschung durch Fremdmoleküle. Die Deaktivierung kann hierbei z. B. über Ladungstransferprozesse (Elektronen- oder Protonentransfer mit anschließendem Rücktransfer) oder strahlungslosen Energietransfer (z. B. Förster-Resonanzenergietransfer) von einem Donor- auf ein Akzeptormolekül stattfinden. Des Weiteren sind auch Mechanismen über Exciplex-/bzw. Excimerbildung möglich.

2.1.2 Spektroskopie im infraroten Spektralbereich

Der Spektralbereich von etwa $0,75 \mu\text{m}$ bis $1000 \mu\text{m}$ wird als Infrarotbereich (IR) bezeichnet. Durch Absorption von infrarotem Licht können Molekülschwingungen und -rotationen angeregt werden. Für gewöhnlich wird in der Infrarotspektroskopie anstelle der Wellenlänge λ die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ angegeben. Diese Größe stellt den Kehrwert der

Wellenlänge dar und wird in der Einheit cm^{-1} angegeben. Der Infrarotbereich kann in drei Teilgebiete unterteilt werden:

- *Fernes Infrarot* ($30\ \mu\text{m}$ – $1000\ \mu\text{m}$, $330\ \text{cm}^{-1}$ – $10\ \text{cm}^{-1}$)
In diesem Spektralbereich kann man Molekülrotationen und Gerüstschwingungen beobachten.
- *Mittleres Infrarot* ($3\ \mu\text{m}$ – $30\ \mu\text{m}$, $3300\ \text{cm}^{-1}$ – $330\ \text{cm}^{-1}$)
Hier können Molekülgrundschwingungen beobachtet werden.
- *Nahes Infrarot* ($0,75\ \mu\text{m}$ – $3\ \mu\text{m}$, $13000\ \text{cm}^{-1}$ – $3300\ \text{cm}^{-1}$)
In diesem Bereich liegen Oberton- und Kombinationsschwingungen der Grundschwingungen.

Ein vereinfachtes Modell zur Beschreibung von Molekülschwingungen ist der harmonische Oszillator. Bei der Betrachtung eines zweiatomigen Moleküls kann man sich beispielsweise vorstellen, es bestehe aus zwei Massepunkten m_1 und m_2 , die durch eine elastische Feder verknüpft sind. Werden die beiden Massen nun aus ihrem Gleichgewichtsabstand r_0 ausgelenkt, so entsteht eine rücktreibende Kraft, die nach dem *Hookeschen Gesetz* proportional zur Auslenkung x ist.

$$F = -k \cdot x \quad (2.4)$$

Die Kraftkonstante k ist hierbei im Molekül ein Maß für die Bindungsstärke zwischen den Atomen. Für die potentielle Energie V des harmonischen Oszillators als Funktion des Kernabstands r ergibt sich dann:

$$V(r) = \frac{1}{2} k x^2 = 2\pi^2 \mu \nu_{osc}^2 x^2 \quad (2.5)$$

wobei $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$ die reduzierte Masse und ν_{osc} die Schwingungsfrequenz des Oszillators darstellen. Durch Umstellen erhält man für ν_{osc} den folgenden Ausdruck:

$$\nu_{osc} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.6)$$

Mit Hilfe der Schrödingergleichung können die quantisierten Schwingungsenergieeigenwerte berechnet werden. Für den linearen harmonischen Oszillator erhält man

$$E = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad (2.7)$$

wobei v die Schwingungsquantenzahl ($v = 0, 1, 2, 3, 4, \dots$) und h das Plancksche Wirkungsquantum sind. Anhand dieser Gleichung wird deutlich, dass auch im Fall $v = 0$ eine Nullpunktsenergie $E_0 = \frac{1}{2} h\nu$ vorhanden ist, das Molekül also immer eine Grundschwingung aufweist. Die Auswahlregeln für Dipolübergänge erlauben nur Übergänge für die

$\Delta v = \pm 1$ gilt. Nach dem Modell des harmonischen Oszillators sind die Schwingungsenergieniveaus äquidistant. Er stellt jedoch nur eine grobe Näherung der tatsächlichen Verhältnisse im Molekül dar. Eine weitaus bessere Beschreibung liefert das Modell des anharmonischen Oszillators. Hierbei wird die abstoßende Wechselwirkung zwischen den Atomkernen ebenso berücksichtigt wie die Dissoziation des Moleküls. Die Potentialkurve kann hier näherungsweise durch die *Morsefunktion* wiedergegeben werden:

$$E = D_e [1 - e^{a(r_e - r)}]^2 \quad \text{mit : } a = \sqrt{\frac{k_e}{2D_e}} \quad (2.8)$$

D_e ist hierbei die Dissoziationsenergie, r_e der Gleichgewichtsabstand und a eine Konstante, die sich aus der Kraftkonstante im Minimum k_e und der Dissoziationsenergie ergibt. Die Energieniveaus im anharmonischen Oszillator sind nicht mehr äquidistant, ihr Abstand nimmt mit zunehmender Schwingungsquantenzahl v ab. Des Weiteren sind nun Übergänge mit $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ erlaubt, wodurch zusätzliche Absorption durch Obertöne auftreten kann.

Normalmoden

Für ein Molekül mit N Atomen ergeben sich für ein lineares Molekül $3N-5$, für ein nichtlineares $3N-6$ interne Freiheitsgrade, die Normalmoden. Die übrigen 5, bzw. 6 Freiheitsgrade entfallen auf die Rotations- und Translationsbewegung des Moleküls als Ganzes. Eine Normalmode zeichnet sich dadurch aus, dass alle beteiligten Atome mit derselben Frequenz schwingen. Je nach Art der Schwingung unterscheidet man zwischen Valenzschwingungen (ν) und Deformationsschwingungen (δ). In beiden Fällen kann zwischen symmetrischen und antisymmetrischen Schwingungen unterschieden werden, je nachdem ob die Molekülsymmetrie erhalten bleibt oder nicht. Deformationsschwingungen können noch weiter unterteilt werden, je nachdem, ob sie eben (*in plane*) oder uneben (*out of plane*) stattfinden, ob es sich um Biege- (*bending*), Pendel- (*rocking*), Torsions- (*twisting*) oder Kippschwingungen (*wagging*) handelt. Trotz der großen Anzahl an möglichen Normalmoden bei großen Molekülen gilt die Infrarotspektroskopie als sehr struktursensitive Methode. Gerade oberhalb von etwa 1500 cm^{-1} treten Schwingungen auf, die sehr charakteristisch für bestimmte Bindungen oder funktionelle Gruppen sind. Weiterhin stellt die Infrarotspektroskopie ein Mittel dar, um bereits geringe Änderungen an Bindungslängen oder -kräften, beispielsweise bedingt durch Isotopenaustausch oder die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, nachzuweisen. Im Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} befindet sich der sogenannte *Fingerprint-Bereich*. Hier können Gerüstschwingungen beobachtet werden, die einander häufig überlagern, sowie Kombinationsschwingungen. Dieser Bereich ist häufig nur schwer auszuwerten, liefert jedoch einen deutlichen Nachweis für eine Probe, deren Spektrum bekannt ist. Die auftretenden anharmonischen Kopplungen an niederfrequente Schwingungsmoden können zu einer erheblichen Temperaturabhängigkeit der Absorptionsbanden führen. Dies muss unter Umständen, ebenso wie die Kopplung an Schwingungen von Lösungsmittelmolekülen,

bei der Auswertung der Infrarotspektren berücksichtigt werden.

Infrarotspektroskopie an Proteinen

Infrarotspektroskopische Untersuchungen an Proteinen liefern Informationen über die Umgebung des Proteins, die Modifikation einzelner Gruppen sowie über die Sekundärstruktur des Proteins. Hierbei spielt neben den Absorptionsbanden der Seitenketten vor allem die Absorption des Peptidrückgrats eine bedeutende Rolle. Die wichtigsten Schwingungsbanden des Peptidrückgrats werden im Folgenden vorgestellt [20–24].

Amid A und B (um 3300 cm^{-1} und um 3070 cm^{-1})

Es handelt sich hierbei ausschließlich um N-H-Streckschwingungen. Sie zeigen keine Abhängigkeit von der Konformation des Peptidrückgrats, ihre Lage ist jedoch abhängig von der Stärke der Wasserstoffbrücken.

Amid I (um 1650 cm^{-1})

Die Amid I-Mode beruht hauptsächlich auf einer C=O-Streckschwingung mit geringeren Anteilen anderer Schwingungen. Die Kopplung an die C=O-Schwingungen benachbarter Peptidgruppen bewirkt, dass die Amid I-Bande sensibel auf die Struktur des Peptidrückgrats reagiert. Die Lage und die Intensität der Absorptionsbande hängt mit den Diederwinkeln ϕ und ψ und damit mit der Sekundärstruktur des Proteins zusammen. Während eine *Random-Coil*-Struktur eine Amid I-Bande um 1650 cm^{-1} zeigt, absorbieren Schleifen um 1675 cm^{-1} . Eine α -helicale Struktur absorbiert um 1650 cm^{-1} und eine β -Faltblatt-Struktur zeigt eine aufgespaltene Amid I-Bande, bedingt durch eine Kopplung der Übergangsdipolmomente der einzelnen Amid I-Moden, mit Absorptionsmaxima um 1630 cm^{-1} und 1685 cm^{-1} [25].

Die Amid I-Bande wird von einer starken Wasserbande überlagert, was die Auswertung erschwert. Daher ist es häufig notwendig, Proteine in D_2O zu untersuchen, das im Bereich der Amid I-Bande eine geringere Absorption aufweist (siehe hierzu auch Kapitel 5.3.1). Dies bringt jedoch mit sich, dass die durch den H/D-Austausch veränderten Massen der schwingenden Atome im Molekül zu einer Verschiebung der Absorptionsbanden führen. Für die Amid I-Bande beobachtet man je nach Struktur des Proteins typischerweise eine Verschiebung von bis zu 10 cm^{-1} .

Amid II (um 1550 cm^{-1})

Bei der Amid II-Mode handelt es sich um die Kombination aus einer N-H-Biegeschwingung (40-60%), einer C-N-Streckschwingung (18-40%) und geringen Anteilen einer C-C-Streckschwingung (ca. 10%). Die Amid II-Bande zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der Sekundärstruktur des Proteins, diese ist jedoch nicht so eindeutig auszuwerten wie im Falle der Amid I-Bande. Ein H/D-Austausch an der Aminogruppe führt zu einer bathochromen Verschiebung der Amid II-Bande um bis zu 100 cm^{-1} auf 1460 cm^{-1} – 1490 cm^{-1} . Durch die Frequenzverschiebung der N-H-Biegeschwingung koppelt diese

| Aminosäure | Bandenposition / cm^{-1} | | Zuordnung |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|------------------------------|
| | H_2O | D_2O | |
| Asparaginsäure, D | 1716 | 1713 | $\nu(\text{C}=\text{O})$ |
| | 1574-1579 | 1584 | $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ |
| | 1402 | 1404 | $\nu_s(\text{COO}^-)$ |
| | 1264-1450 | 955-1058 | $\delta(\text{COH})$ |
| | 1160-1253 | 1250-1300 | $\nu(\text{C-O})$ |
| Cystein, C | 2551 | 1849 | $\nu(\text{S-H})$ |
| Lysin, K | 1626-1629 | 1201 | $\delta_{as}(\text{NH}_3^+)$ |
| | 1526-1527 | 1170 | $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ |
| Threonin, T <i>allgemein</i> | 1075-1150 | | $\nu(\text{C-O})$ |
| | 1445-1480 | | $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ |
| | 1425-1475 | | $\delta(\text{CH}_2)$ |
| | 1315-1350 | | $\delta(\text{CH})$ |
| | 1170-1382 | | $\gamma_w(\text{CH}_2)$ |
| | 1063-1295 | | $\gamma_t(\text{CH}_2)$ |
| | 724-1174 | | $\gamma_r(\text{CH}_2)$ |

Tabelle 2.1: Schwingungen der Seitenketten für die Aminosäuren Asparaginsäure, Cystein, Lysin und Threonin. Die angegebenen Werte unter *allgemein* beinhalten die Schwingungen der Seitenketten für Alanin und der Kohlenstoffketten der anderen Aminosäuren. Zeichenerläuterung: ν : Streckschwingungen (ν_s : symmetrisch, ν_{as} : antisymmetrisch), δ : Biegeschwingung in der Ebene (δ_s : symmetrisch, δ_{as} : antisymmetrisch), γ_w : Kippschwingung, γ_t : Torsionsschwingung, γ_r : Pendelschwingung. Die Bandenposition der unter *allgemein* zusammengefassten Schwingungen können durch den Austausch von H_2O durch D_2O um etwa $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ verschoben werden [20, 21].

nicht mehr an die C-N-Streckschwingung und trägt nicht mehr zu dieser Mode bei, die daher nun als Amid II' bezeichnet wird.

Amid III ($1400\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$)

Die Amid III-Mode ist eine Kombinationsschwingung aus NH-Biege- und C-N-Streckschwingung mit geringen Anteilen verschiedener anderer Gruppen, wobei auch die Seitenketten eine Rolle spielen können. Auch sie wird durch die Sekundärstruktur des Proteins beeinflusst. Durch eine Deuterierung wird die N-H-Biegeschwingung von den anderen Schwingungen entkoppelt. Diese gehen in anderen Moden auf und es ist keine Amid III-Bande mehr zu beobachten.

Neben dem Peptidrückgrat absorbieren auch die Seitenketten Licht im infraroten Spektralbereich. Je nach Seitenkette treten unterschiedliche Schwingungen auf. In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten Absorptionsbanden der Aminosäureseitenketten aufgelistet, die in dem in dieser Arbeit untersuchten bityklichen Azopeptid vorkommen.

Verwendete Methoden

Konventionelle dispersive IR-Spektrometer bestehen im Wesentlichen aus einer Lichtquelle, einem Monochromator und einem Detektor. Als Lichtquellen dienen Nernststifte (Stäbchen aus ZrO_2 mit Zusätzen von Y_2O_3), Globare (SiC-Stäbe) oder mit Heizwendeln umwickelte Keramikstäbchen, die von gesinterten Schichten aus Aluminiumoxid und Zirkonsilikat umgeben sind. Die Spektrometer werden für gewöhnlich als Zweistrahlgeräte betrieben mit einem Meßstrahl, der die Probe passiert, und einem Referenzstrahl. Mit Hilfe des Monochromators (Beugungsgitter oder Prisma) wird das Licht divergiert und durch Drehen eine Wellenlänge nach der anderen auf den Detektor gelenkt. Als Empfänger können thermische Detektoren (z. B. DTGS, Deuterotriglycinsulfat) oder Quantendetektoren eingesetzt werden. Quantendetektoren besitzen den Vorteil, dass sie sehr schnell und empfindlich sind, ihre Empfindlichkeit jedoch nicht wellenzahlabhängig ist. Ihr Funktionsprinzip basiert auf dem photoelektrischen Effekt, bei dem durch einfallende Photonen in einem photoaktiven Material Elektronen freigesetzt werden, die verstärkt und als Strom gemessen werden können. Weit verbreitet ist der MCT-Detektor (engl. **m**ercury **c**admium **t**elluride), der eine hohe Ansprechgeschwindigkeit und Empfindlichkeit aufweist, jedoch eine Kühlung mit flüssigem Stickstoff benötigt. Die Kühlung ist notwendig, da bei einer schmalen Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband ein Übergang eines Elektrons auch thermisch angeregt werden kann.

Für die Aufnahme von IR-Spektren haben sich die Fourier-Transform-(FT)-IR-Spektrometer durchgesetzt. Diese verwenden die selben Strahlungsquellen und Detektoren, das Herzstück ist allerdings ein Interferometer. Das Licht wird hierbei durch einen Strahlteiler aufgeteilt. Während der eine Strahl auf einen festen Spiegel trifft, wird der andere auf einen beweglichen Spiegel gelenkt. Beide Teilstrahlen werden wieder auf den Strahlteiler zurückreflektiert und können dort entsprechend ihrem Gangunterschied, der durch Verschieben des beweglichen Spiegels variiert werden kann, interferieren. Der modulierte Strahl durchläuft die Probe und wird auf den Detektor fokussiert, der das Interferogramm registriert. Durch einen mathematischen Prozess, die Fouriertransformation, erhält man ein Spektrum, das mit dem Referenzspektrum verglichen wird und schließlich das IR-Spektrum ergibt. Das Fourierpaar stellen hierbei die Wellenzahl ($\tilde{\nu}$ in cm^{-1}) und die Verschiebestrecke des beweglichen Spiegels (x in cm) dar. Das entsprechende Spektrum ergibt sich folgendermaßen:

$$I(\tilde{\nu}) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad (2.9)$$

Die FTIR-Technik bieten gegenüber konventionellen dispersiven IR-Spektrometern folgende Vorteile: Die Aufnahmezeit verkürzt sich, da alle Wellenlängen gleichzeitig aufgenommen werden (Multiplex- oder Fellgett-Vorteil). Die gesamte Leistung der Lichtquelle steht zur Verfügung, woraus ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultiert (Jacquinot-Vorteil). Die Verwendung eines Helium-Neon-Lasers zur Bestimmung der Position des beweglichen Spiegels erlaubt eine präzise Wellenlängenkalibrierung (Connes-Vorteil).

Meistens werden FTIR-Spektren in Transmission aufgenommen. Sie eignet sich sowohl für gasförmige als auch für flüssige Proben, wobei zu beachten ist, dass die Küvettenfenster IR-durchlässig sind. Feste Proben können ebenfalls untersucht werden, beispielsweise eingebettet in einem Pressling aus Kaliumbromid. Da die meisten Lösungsmittel gute IR-Absorber sind müssen Küvetten, die zur Messung von Stoffen in Lösung eingesetzt werden einen kleinen optischen Lichtweg besitzen und die zu untersuchende Substanz eine entsprechend hohe Konzentration aufweisen. Weiterhin muss der Lichtweg in Luft möglichst kurz und/oder frei von IR-absorbierenden Gasen wie CO_2 oder H_2O sein, weshalb IR-Spektrometer häufig mit Stickstoff oder CO_2 -freier, trockener Luft gespült werden. Eine andere Möglichkeit stellt die ATR-Technik (abgeschwächte Totalreflexion, engl. *attenuated total reflection*) dar, die auch die Untersuchung von Proben ermöglicht, die für Messungen in Transmission ungeeignet sind, wie beispielsweise Pasten, Oberflächenbeschichtungen oder Proben in wässriger Lösung. Dabei wird die Probe auf einen Kristall mit hohem Brechungsindex aufgebracht (z. B. Diamant). Der den Kristall unter ein- oder mehrfacher Totalreflexion passierende IR-Strahl dringt um wenige μm in die zu untersuchende Substanz ein und wird dadurch wellenlängenabhängig abgeschwächt.

2.2 Ultrakurzzeitspektroskopie

Für die Untersuchung von schnellen Prozessen auf molekularer Ebene sind sehr hohe Zeitaufösungen notwendig. Die Anreg-Abtast-Spektroskopie ist hierfür mittlerweile eine gängige Technik, die Zeitaufösungen bis in den Femtosekundenbereich ermöglicht. Hierbei wird die Probe zunächst durch einen kurzen Laserpuls angeregt und anschließend mit einem zweiten Puls der Zustand der Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgefragt. Der schematische Aufbau eines solchen Experiments ist in Abbildung 2.2 gezeigt.

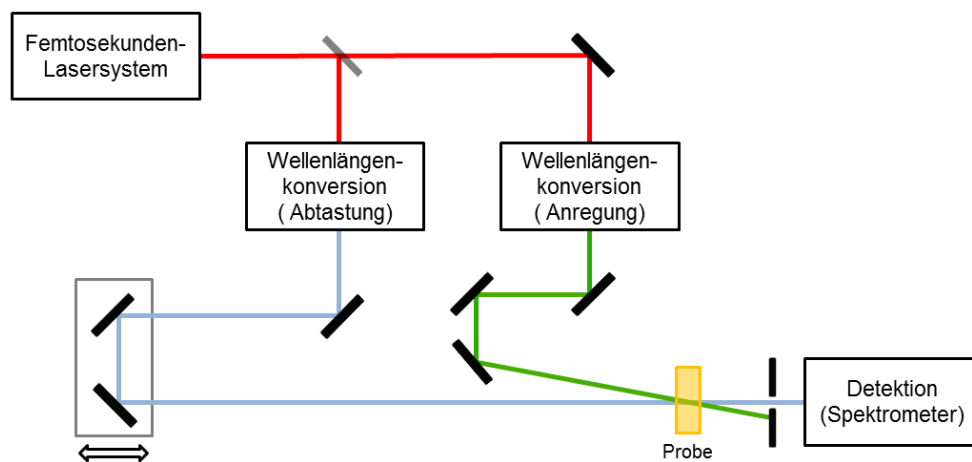


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Anreg-Abtast-Experiments.

Zur Erzeugung von Anregungs- und Abtastpuls wird der Laserpuls, den ein Femtosekunden-Lasersystem liefert, zunächst mittels einen Strahlteilers aufgeteilt. Mit Hilfe einer variablen Verzögerungsstrecke, kann der Abtastpuls nun relativ zum Anregungspuls zeitlich verzögert werden. Da Femtosekunden-Lasersysteme nur Pulse einer bestimmten Wellenlänge liefern, ist es notwendig mit Hilfe von nichtlinear optischen Prozessen die Wellenlängen von Anregungs- und Abtastpuls entsprechend der jeweiligen Anforderungen anzupassen. Heute sind solche Messapparaturen bereits kommerziell erhältlich. Die Zeitauflösung wird hierbei durch die Länge der verwendeten Lichtpulse limitiert.

2.2.1 Nichtlineare Optik

In der linearen Optik ist die Polarisation \vec{P} im Medium proportional zu der Feldstärke \vec{E} der eintreffenden Strahlung.

$$\vec{P} = \epsilon_0 \cdot \chi^{(1)} \cdot \vec{E} \quad (2.10)$$

Die Wechselwirkung wird hierbei durch den dielektrischen Suszeptibilitätstensor erster Ordnung $\chi^{(1)}$ charakterisiert, ϵ_0 ist die absolute Dielektrizitätskonstante des Vakuums. Dieser lineare Zusammenhang impliziert, dass sich die Frequenz des eingestrahnten Lichts beim Durchgang durch die Materie nicht ändert. Diese Gleichung gilt in guter Näherung für kleine elektrische Feldstärken. Bei hohen Strahlungsintensitäten, wie sie z. B. bei kurzen Laserpulsen auftreten, ist der Zusammenhang zwischen Polarisation und Feldstärke nicht länger linear. Bei der Beschreibung der Polarisation müssen nun auch Terme höherer Ordnung berücksichtigt werden. Dieses nichtlineare Verhalten kann mit Hilfe einer Taylor-Entwicklung der Polarisation beschrieben werden:

$$\vec{P}(\vec{E}) = \epsilon_0 \left[\chi^{(1)} \vec{E} + \left(\chi^{(2)} \vec{E} \right) \vec{E} + \left(\left(\chi^{(3)} \vec{E} \right) \vec{E} \right) \vec{E} + \dots \right] \quad (2.11)$$

Die Suszeptibilitäten höherer Ordnung sind deutlich kleiner als die lineare Suszeptibilität ($\chi^{(1)} \approx 1$, $\chi^{(2)} \approx 10^{-10} \frac{cm}{V}$, $\chi^{(3)} \approx 10^{-17} \frac{cm^2}{V^2}$) und sind daher bei niedrigen Feldstärken zu vernachlässigen. Erst bei sehr hohen Feldstärken spielen sie eine Rolle. Während sich in der linearen Optik mehrere elektromagnetische Wellen, die gleichzeitig ein Medium durchlaufen nach dem Superpositionsprinzip nicht gegenseitig beeinflussen, resultiert in der nichtlinearen Optik aus den Beiträgen höherer Ordnung und der daraus folgenden Wechselwirkung mehrerer Lichtbündel die Entstehung neuer Frequenzen.

Überlagert man z. B. zwei ebene elektromagnetische Wellen mit der Ausbreitungsrichtung \vec{z} und den Frequenzen ω_1 und ω_2 , so ergibt sich für das elektrische Feld:

$$\vec{E} = (E_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + E_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z})) \cdot \hat{e}_x \quad (2.12)$$

\vec{k}_n ist hierbei der Impuls der entsprechenden elektromagnetischen Welle und \hat{e}_x der Einheitsvektor in x-Richtung. Nach Gleichung 2.11 erhält man somit für die induzierte

Polarisation in einem isotropen dielektrischen Medium:

$$\begin{aligned}
 \vec{P}(\omega) &= \vec{P}^{(1)} + \vec{P}^{(2)} + \dots \\
 &= \epsilon_0 \chi^{(1)} \hat{e}_x \left[E_1 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + E_2 \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right] \\
 &\quad + \epsilon_0 (\chi^{(2)} \hat{e}_x) \hat{e}_x \left[E_1^2 \cos^2(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) + E_2^2 \cos^2(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right. \\
 &\quad \left. + 2E_1 E_2 \cos(\omega_1 t + \vec{k}_1 \vec{z}) \cos(\omega_2 t + \vec{k}_2 \vec{z}) \right]
 \end{aligned} \tag{2.13}$$

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

$$\begin{aligned}
 \vec{P}^{(2)}(\omega) &= \epsilon_0 (\chi^{(2)} \hat{e}_x) \hat{e}_x \left(\frac{1}{2} E_1^2 + \frac{1}{2} E_2^2 \right) \\
 &\quad + \epsilon_0 (\chi^{(2)} \hat{e}_x) \hat{e}_x \left[\frac{1}{2} E_1^2 \cos(2\omega_1 t + 2\vec{k}_1 \vec{z}) + \frac{1}{2} E_2^2 \cos(2\omega_2 t + 2\vec{k}_2 \vec{z}) \right] \\
 &\quad + \epsilon_0 (\chi^{(2)} \hat{e}_x) \hat{e}_x \left[E_1 E_2 \cos\left((\omega_1 + \omega_2)t + (\vec{k}_1 + \vec{k}_2) \vec{z}\right) \right] \\
 &\quad + \epsilon_0 (\chi^{(2)} \hat{e}_x) \hat{e}_x \left[E_1 E_2 \cos\left((\omega_1 - \omega_2)t + (\vec{k}_1 - \vec{k}_2) \vec{z}\right) \right]
 \end{aligned} \tag{2.14}$$

Die durch die Wechselwirkung der beiden elektromagnetischen Wellen induzierte Polarisation dient als Quelle von elektromagnetischen Wellen mit neuen Frequenzen. Die frequenzunabhängigen Terme E_1^2 und E_2^2 werden als optische Gleichrichtung bezeichnet, die Terme mit $2\omega_1$ und $2\omega_2$ beschreiben die Frequenzverdopplung (SHG, engl. **second harmonic generation**) der ursprünglichen Frequenzen, der Term $\omega_1 + \omega_2$ steht für die Summenfrequenz- (SFG, engl. **sum frequency generation**) und $\omega_1 - \omega_2$ für die Differenzfrequenzbildung (DFG, engl. **difference frequency generation**). Da es sich in allen genannten Fällen um die Wechselwirkung von drei elektromagnetischen Wellen handelt, nennt man diese Prozesse auch Dreiwellenmischprozesse. Durch die entsprechende Auswahl geeigneter experimenteller Parameter können einzelne Prozesse sehr effizient ablaufen. Bei Dreiwellenmischprozessen müssen Energie und Impuls erhalten werden. Mit $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ ergibt sich:

$$\hbar\omega_3 = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2 \tag{2.15}$$

$$\vec{k}_3 = \vec{k}_1 + \vec{k}_2 + \Delta\vec{k} \tag{2.16}$$

Die Phasenfehlانpassung $\Delta\vec{k}$ kann durch die Auswahl geeigneter Materialien und Bedingungen minimiert werden, um eine möglichst effiziente Wellenlängenkonversion zu erhalten.

Suszeptibilitäten dritter Ordnung können in analoger Weise betrachtet werden. Wichtige Beispiele hierfür sind die Frequenzverdreifung, Vierwellenmischprozesse, Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation, induzierte Rayleigh- und Raman-Streuung.

Phasenanpassung in nichtlinear optischen Kristallen

Für eine effiziente Wellenlängenkonversion muss die Phasenfehlanpassung $\Delta\vec{k}$ gleich Null sein. Um dies zu erreichen, können die nichtlinearen Eigenschaften doppelbrechender Kristalle genutzt werden. Während biaxiale Kristalle drei Hauptachsen mit unterschiedlichen Brechungsindices aufweisen (n_x, n_y, n_z) besitzen die Hauptachsen von uniaxialen Kristallen lediglich zwei unterschiedliche Brechungsindices ($n_x = n_y \neq n_z$). Bei uniaxialen Kristallen gibt es eine ausgezeichnete Raumrichtung, die als optische Achse bezeichnet wird. Ist ein Laserstrahl senkrecht zu der Ebene polarisiert, die durch die optische Achse und die Ausbreitungsrichtung des Lichts aufgespannt wird, so wird dieser als ordentlich (o, engl. **ordinary**) bezeichnet. Ist er parallel zu dieser Ebene polarisiert, so bezeichnet man ihn als außerordentlich (eo, engl. **extraordinary**). Dabei ist der Brechungsindex des ordentlichen Strahls $n_o(\omega)$ unabhängig von dem Winkel zwischen optischer Achse und Ausbreitungsrichtung des Lichts θ . Beim außerordentlichen Strahl hingegen ist der Brechungsindex in folgender Weise abhängig vom Winkel θ :

$$\frac{1}{n_{eo}(\omega, \theta)} = \sqrt{\frac{\cos^2 \theta}{n_o^2(\omega)} + \frac{\sin^2 \theta}{n_{eo}^2(\omega)}} \quad (2.17)$$

$n_{eo}(\omega)$ ist hierbei der außerordentliche Brechungsindex, wenn die Ausbreitungsrichtung des Lichts senkrecht zur optischen Achse liegt. Jeder Laserstrahl, der auf einen uniaxialen nichtlinearen Kristall trifft kann entsprechend seiner Polarisation in einen ordentlichen und außerordentlichen Anteil zerlegt werden. Je nach Polarisation können verschiedene Laserstrahlen also unterschiedliche Brechungsindices erfahren und bewegen sich somit mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das Medium. Durch die entsprechende Auswahl des Winkels θ kann die Phasenfehlanpassung minimiert und Phasenanpassung erreicht werden. Anschaulich kann die Phasenanpassung als gleichschnelle Ausbreitung der beteiligten Wellenfronten im Medium betrachten werden. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass über die gesamte Länge des nichtlinearen Mediums phasenrichtige Wellenlängenkonversion möglich ist.

Man kann den Typ der Phasenanpassung bei nichtlinear optischen Prozessen nach der Polarisation der beteiligten Strahlen unterteilen: Bei der Typ-I-Phasenanpassung weisen die beiden Strahlen mit den niedrigsten Frequenzen parallele Polarisation auf, während bei der Typ-II-Phasenanpassung diese beiden senkrecht zueinander polarisiert sind. Weiterhin können die Kristalle anhand der Brechungsindices für den ordentlichen und außerordentlichen Strahl klassifiziert werden. Bei positiv uniaxialen Kristallen (z. B. Quarz) ist der Brechungsindex für den außerordentlichen Strahl größer als für den ordentlichen ($n_{eo}(\omega) > n_o(\omega)$), bei negativ uniaxialen Kristallen (z. B. β -Bariumborat (BBO) oder Silberthiogallat (AgGaS₂)) ist der Brechungsindex für den außerordentlichen Strahl kleiner als für den ordentlichen ($n_{eo}(\omega) < n_o(\omega)$).

Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Durch die Dispersion in transparenten Medien, also die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Wellenlänge, ist auch die Gruppengeschwindigkeit des Lichts wellenlängenabhängig. Dadurch werden kurze Laserpulse beim Durchlaufen solcher Medien zeitlich verlängert, wobei die Spektralkomponenten des Pulses auseinander laufen. Im Falle von normaler Dispersion laufen die langwelligen Anteile vor den kurzwelligen und der Puls erhält so einen *positiven Chirp*. Den umgekehrten Fall, einen Puls mit *negativem Chirp*, erhält man in Medien mit negativer Dispersion. Für spektroskopische Untersuchungen mit hoher Zeitaufösung muss diese unvermeidliche Dispersion kompensiert werden. Dies geschieht am Einfachsten mit einer Anordnung aus Gittern oder Prismen, die einen negativen Chirp erzeugt und somit die Gruppengeschwindigkeitsdispersion ausgleichen kann. Für Pulsdauern im Bereich von einigen zehn bis hundert Femtosekunden kann dies mit Hilfe eines Prismenkompressors geschehen, der in Kapitel 2.3.1 näher vorgestellt wird.

2.2.2 Erzeugung ultrakurzer Laserpulse

Für transiente spektroskopische Untersuchungen mit einer Auflösung im Femtosekundenbereich sind ultrakurze Laserpulse notwendig. Nach den Fourier-Theoremen besteht zwischen der Pulsdauer und der spektralen Breite des Pulses folgender Zusammenhang:

$$\Delta\omega\Delta t \geq 1 \quad (2.18)$$

Dies bedeutet, dass je kürzer der Puls ist, desto größer muss die spektrale Bandbreite des Pulses sein. Somit kommen für die Erzeugung kurzer Laserpulse nur solche Verstärkungsmedien in Frage, die eine entsprechende Bandbreite besitzen. Ein häufig eingesetztes Medium ist ein mit Titan dotierter Saphirkristall (Ti:Sa) der mit einer Fluoreszenz zwischen 690 nm und 1080 nm ein breites Spektrum bietet.

In einem Laserresonator werden nur die Wellenlängen verstärkt, deren ganzzahliges Vielfaches der halben Wellenlänge die Resonatorlänge ergibt, da nur dann die Bedingungen für eine stehende Welle zwischen den Resonatorendspiegeln erfüllt sind. Diese sogenannten longitudinalen Moden des Resonators können durch Superposition einen Puls erzeugen, der umso kürzer ist, je mehr Moden überlagert werden. Dazu müssen die Resonatormoden jedoch eine feste Phasenbeziehung zueinander aufweisen. Dies kann mit unterschiedlichen Verfahren der sogenannten Modenkopplung erreicht werden. Man unterscheidet hierbei zwei Fälle: Die aktive und die passive Modenkopplung.

Bei der aktiven Modenkopplung werden die optischen Eigenschaften des Resonators gezielt durch ein externes Signal gesteuert, beispielsweise durch einen akusto- oder elektrooptischen Modulator. Durch eine Kopplung der Modulationsperiode an die Umlaufzeit der Lasermoden im Resonator kann erreicht werden, dass sich die Lasermoden alle in Phase befinden. Die aktive Modenkopplung ist technisch durch die maximal erreichbare Modulationsfrequenz (einige Gigahertz) begrenzt, weshalb die kürzesten erreichbaren Pulsdauern im Bereich von etwa 100 ps liegen.

Um kürzere Laserpulse zu erzeugen kann die passive Modenkopplung genutzt werden. Hierbei moduliert der Laserstrahl selbst mit seiner Intensität die optischen Eigenschaften eines nichtlinearen Mediums, das in den Resonator eingebracht wird. Je höher die Intensität des Lasers ist, desto transparenter wird das Medium. Ein zufällig intensiverer Puls, ein sogenannter Laserspike, erfährt somit eine geringere Absorption im Medium und eine höhere Verstärkung. Innerhalb weniger Resonatorumläufe wächst dieser Puls deutlich an und bestimmt den überwiegenden Teil der gesamten Laseremission, die restlichen Signale werden unterdrückt und bleiben somit unterhalb der Laserschwelle. Nach einer Einschwingphase erhält man die Emission einer Folge von regelmäßigen, kurzen, intensiven Laserpulsen. Für die intensitätsabhängige Abschwächung im Resonator können unterschiedliche Effekte genutzt werden. Mit sättigbaren Absorbern können Pulsdauern im Bereich von einigen wenigen Pikosekunden erreicht werden, wobei sowohl Farbstoffe als auch Halbleitermaterialien als Absorber in Frage kommen. Noch kürzere Pulsdauern können mit Hilfe der Intensitätsabhängigkeit des Brechungsindex (Kerr-Linsen-Modenkopplung) oder der nichtlinearen Polarisationsdrehung, wie sie im in dieser Arbeit verwendeten Clark-Lasersystem eingesetzt wird, erreicht werden. Bei der nichtlinearen Polarisationsdrehung erfährt ein intensiver Puls in einer optischen Faser, z.B. einer mit Erbiumionen dotierten Glasfaser, eine intensitätsabhängige Änderung seines Polarisationszustands. Für gewöhnlich handelt es sich dabei nicht um eine exakte Drehung der Polarisation, sondern man erhält einen elliptischen Polarisationszustand. Dieses Phänomen beruht auf Selbstphasenmodulation, Kreuzphasenmodulation und Doppelbrechung in der optischen Faser. Hinter der Faser befindet sich eine Polarisationsoptik, z. B. ein Faraday-Rotator, der so angeordnet wird, dass bei der höchstmöglichen Intensität maximale Transmission erreicht wird. Der für den Start des Kopplungsmechanismus nötige Laserspike kann entweder aus dem Laseruntergrund stammen oder auch durch eine Bewegung des Resonatorendspiegels erzeugt werden. Durch eine Verlängerung der Strecke im nichtlinearen Medium im Resonator kann die Wahrscheinlichkeit für das Selbststarten der Modenkopplung erhöht werden [26–30].

Aufgrund der Zerstörschwelle der verwendeten Materialien ist die erreichbare Intensität limitiert, so dass nur relativ schwache Pulse ausgekoppelt werden können. Um Pulse mit höheren Intensitäten zu erreichen, werden sie mit Hilfe einer Anordnung von Prismen zunächst zeitlich gestreckt. Diese langen Pulse besitzen geringere Spitzenintensitäten und können in einen weiteren Laserresonator eingekoppelt und verstärkt werden. Anschließend werden sie mit Hilfe eines Pulscompressors wieder komprimiert. Im Pulsstreckter erhalten die Pulse zunächst einen Chirp, der nach der Verstärkung im Kompressor wieder entfernt wird. Daher wird diese Technik als *Chirped Pulse Amplification* (CPA) bezeichnet [31, 32].

2.3 Experimentelle Aufbauten

Für die zeitaufgelöste Spektroskopie im Femtosekundenbereich ist zunächst eine Quelle von entsprechend kurzen Laserpulsen notwendig. Für die Anreg-Abtast-Technik müssen die Pulse aus dem Kurzzeitalasersystem noch entsprechend der benötigten Wellenlängen

konvertiert werden. Die Anregungspulse werden mit Hilfe eines oder mehrerer nichtlinearer Prozesse auf die entsprechende Wellenlänge gebracht. Breitbandige Abtastpulse im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich können in einem nichtlinearen Prozess, der Weißlichterzeugung, generiert werden, während für die Erzeugung von Abtastpulsen im mittleren infraroten Spektralbereich eine Reihe aufeinanderfolgender nichtlinearer Prozesse notwendig ist.

Das Clark-CPA-2001 System

Als Quelle von ultrakurzen Laserpulsen wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Anreg-Abtast-Experimente ein Titan-Saphir-Festkörperlaser des Modells Clark MXR CPA 2001 verwendet. Dieser setzt sich zusammen aus einem Diodenlaser, einem modengekoppelten Erbium-Glasfaseroszillator, einem Pulsstrecke, einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser, einem regenerativen Titan-Saphir-Verstärker und einem Pulskompressor [33].

Bei dem Diodenlaser handelt es sich um einen Halbleiterlaser (InGaAs, III-V-Halbleiter), der kontinuierlich bei 980 nm mit einer Leistung von etwa 160 mW emittiert und als Pumplaser für den Glasfaseroszillator dient. Dieser besteht aus einem Ringresonator in Glasfasertechnik mit einer Freistrahlstrecke für optische Elemente. Ein Abschnitt der Glasfaser ist mit Er^{3+} -Ionen dotiert und dient als aktives Medium. Der undotierte Teil der Faser weist eine negative Dispersion auf und kann somit die Gruppengeschwindigkeitsdispersion des aktiven Mediums und der anderen optischen Elemente ausgleichen. Über eine Faserverzweigung wird das Licht des Diodenlasers eingekoppelt und führt im aktiven Medium zu einer Besetzungsinversion. Die richtige Einstellung der Wellenplättchen in der Freistrahlstrecke erlaubt den Pulsbetrieb des Ringlasers über nichtlineare Polarisationsdrehung. Des Weiteren befinden sich ein doppelbrechender Filter als Bandpass und ein optischer Isolator im Strahlengang, um den Oszillator nur in eine Richtung zu betreiben. Durch einen Polarisationsstrahlteiler können die Pulse, die eine Zentralwellenlänge von 1550 nm und eine Repetitionsrate von 35 MHz aufweisen, ausgekoppelt werden. In einem Lithiumborat-Kristall werden die Pulse auf 775 nm frequenzverdoppelt. Die Emission wird von einer Photodiode registriert. Der Faserlaser dient als Zeitstandard des gesamten Lasersystems. Alle anderen Prozesse sind mit diesem Signal synchronisiert.

Diese schwachen Laserpulse werden nach dem CPA-Prinzip in einem regenerativen Titan-Saphir-Laser verstärkt. Hierfür werden die Pulse zunächst auf etwa 200 ps gestreckt und in einen Titan-Saphir-Kristall eingekoppelt. Der Titan-Saphir-Verstärker wird mit einem gütegeschalteten frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser gepumpt. Das aktive Medium des Nd:YAG-Lasers wird wiederum von einer Bogenlampe kontinuierlich gepumpt. Ein akustooptischer Modulator im Resonator verhindert die ungewollte Verstärkung spontaner Emission und sorgt so für maximale Besetzungsinversion. Durch Ansteuerung des akustooptischen Modulators wird der Resonator auf hohe Güte geschaltet. Dadurch wird ein kurzer Laserpuls mit einer Zentralwellenlänge von 1064 nm emittiert. In einem KTP-Kristall (**K**alium**t**itanyl**p**hosphat) innerhalb des Resonators wird dieser Puls frequenzverdoppelt und über einen dichroitischen Spiegel ausgekoppelt. Auf diese Weise

erhält man Pulse mit einer Zentralwellenlänge von 532 nm und etwa 7,5 mJ Pulsenergie bei einer Repetitionsrate von 1 kHz.

Durch Einkopplung des frequenzverdoppelten Nd:YAG-Lasers in den regenerativen Verstärker wird dort im Titan-Saphir-Kristall eine maximale Besetzungsinversion erreicht. In mehreren Umläufen wird nun ein Puls aus dem Faserlaser hochverstärkt. Nach etwa sieben Umläufen ist die Sättigung erreicht und der Puls wird mit einer etwa 10^6 -fach höheren Energie wieder ausgekoppelt. Ein- und Auskopplung in bzw. aus dem Titan-Saphir-Resonator werden mit einer Kombination aus einer Pockelszelle und einem polarisationsabhängigen Strahlteiler gesteuert. Anschließend werden die verstärkten Pulse in einem Pulskompressor wieder komprimiert.

Man erhält auf diese Weise Laserpulse mit einer Pulsdauer von etwa 150 fs bei einer Wellenlänge von 775 nm mit einer Pulsenergie von etwa 800 μ J bei einer Repetitionsrate von 1 kHz.

2.3.1 Wellenlängenkonversion

Der eingesetzte Kurzpulslaser liefert Pulse mit einer Zentralwellenlänge von 775 nm. Damit die zu untersuchende Probe bei einer für sie geeigneten Wellenlänge angeregt werden kann, muss das Licht in entsprechenden nichtlinearen Prozessen konvertiert werden. Weiterhin ist es notwendig auch das Abtastlicht je nach Bedarf umzuwandeln. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit genutzten Möglichkeiten zur Wellenlängenkonversion vorgestellt.

Weißlichterzeugung

Spektral breite Weißlichtpulse werden zum einen als Abtastpulse in den UV/vis-Experimenten eingesetzt aber auch als Seedpulse (*engl. seed* = Saat) für weitere nicht-lineare Prozesse benötigt. Beim Durchgang durch ein transparentes Medium erfährt der kurze fokussierte Laserpuls eine spektrale Verbreiterung [34], die je nach Medium unterschiedlich ist. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde Saphir oder CaF_2 zur Weißlichterzeugung genutzt, wobei CaF_2 aufgrund einer größeren Bandlücke das spektral breitere Weißlicht liefert und somit auch etwa 100 nm weiter in den UV-Bereich hineinreicht [35]. Während Saphir jedoch sehr stabil ist und die Weißlichterzeugung über Monate und Jahre ermöglicht, wird das CaF_2 -Substrat durch die hohe Intensität an der Oberfläche zerstört. Durch eine Bewegung in zwei Richtungen senkrecht zum einfallenden Strahl kann die Lebensdauer des CaF_2 -Fensters auf einige Tage verlängert werden. Die Bewegung hat jedoch zur Folge, dass das CaF_2 -Weißlicht deutlich instabiler ist, als das Saphir-Weißlicht.

Der genaue Mechanismus der Weißlichterzeugung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Als gesichert gilt jedoch, dass Selbstfokussierung sowie Selbstphasenmodulation bei diesen Prozessen eine bedeutende Rolle spielen [34, 36–38]. Bei der Selbstfokussierung, auch transversaler Kerr-Effekt, handelt es sich um einen nichtlinear optischen Effekt dritter Ordnung, der auf der Intensitätsabhängigkeit des Brechungsindex basiert. Bei einer gaußförmigen Intensitätsverteilung erfahren die schwachen Außenbezirke einen schwächeren

Brechungsindex als das intensive Zentrum den Pulses. Dies bewirkt eine Fokussierung des Strahles und die Ausbildung eines Filaments. Die Selbstphasenmodulation basiert auf dem zeitlichen Kerr-Effekt und bewirkt eine zeitabhängige Phasenverschiebung und damit eine spektrale Verbreiterung des Pulses. Die spektralen Eigenschaften des Pulses werden zum einen durch die Bandlücke des verwendeten Materials, aber auch durch Vier-Wellenmischprozesse sowie stimulierte Raman- und Brillouin-Streuung bestimmt [39, 40].

Frequenzverdopplung

Laserpulse mit der verdoppelten Frequenz der Laserfundamentalen wurden in dieser Arbeit für die Anregung einiger Proben genutzt. Zudem fungieren sie als Pumppulse für die verwendeten nichtlinear optisch parametrischen Verstärkungsprozesse, die im folgenden Abschnitt erläutert werden. Sie besitzen eine Wellenlänge von 388 nm.

Bei der Frequenzverdopplung handelt es sich um einen Spezialfall der Summenfrequenzerzeugung, wobei die beiden einlaufenden Photonen die gleiche Energie besitzen (vergleiche hierzu 2.14). Als Medium für diesen Prozess wurde ein BBO-Kristall ($d = 0,5$ mm, Schnittwinkel $\theta = 30^\circ$) genutzt.

Nichtkollinear optisch parametrischer Verstärker

Mit Hilfe eines nichtkollinear optisch parametrischen Verstärkers (NOPA, engl. non-collinear **optical parametric amplifier**) ist es möglich einen schmalen Spektralbereich aus dem breitbandigen Weißlicht auszuwählen und zu verstärken, so dass es in den verwendeten Experimenten zur Anregung eingesetzt werden kann [41–44]. Es handelt sich hierbei um einen nichtlinear optischen Prozess zweiter Ordnung, der auf dem Prinzip des Drei-Wellen-Mischens basiert. Hierfür wird ein Pumpuls, hier ein Lichtpuls mit der Wellenlänge 388 nm, in einen nichtlinear optischen Kristall, hier BBO ($d = 2$ mm, $\theta = 28,5^\circ$), fokussiert. Durch räumlichen und zeitlichen Überlapp mit einem Seedpuls wird die Wellenlänge des Seedpulses verstärkt und der Pumpuls in einen entsprechenden Signal- und einen Idlerpuls aufgespalten. Bei der Einstrahlung von gechirptem Seed-Weißlicht kann durch eine entsprechende zeitliche Verzögerung und den Kippwinkel des BBO-Kristalls eine Wellenlänge ausgewählt werden, die dann im NOPA entsprechend verstärkt wird. Der schematische Aufbau eines solchen NOPA-Systems ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

Durch die nichtkollineare Anordnung gilt die Phasenanpassung für einen breiteren Spektralbereich. Gleichzeitig werden so die Gruppengeschwindigkeiten von Pump- und Seedpuls in Signalrichtung angepasst. Auf diese Weise lassen sich im sichtbaren Spektralbereich Pulse von etwa 470 nm bis 750 nm erzeugen. Mit Hilfe des NOPAs können auch Pulse im nahen infraroten Spektralbereich von etwa 900 nm bis 1200 nm verstärkt werden, allerdings ist in diesem Fall eine Optimierung des Phasenanpassungswinkels erforderlich.

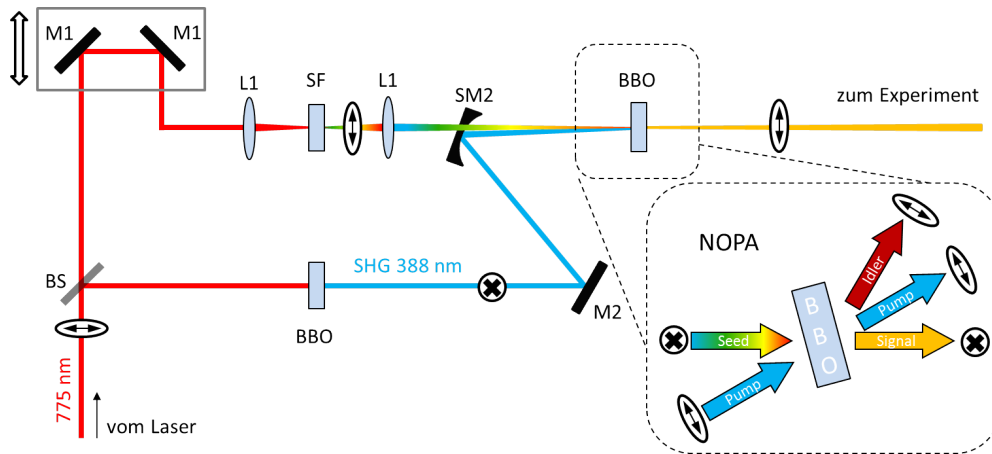


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines NOPA-Aufbaus. Die Polarisierungen der einzelnen Pulse sind sinnbildlich dargestellt. M1: Hochreflektierender Spiegel für 775 nm, M2: Hochreflektierender Spiegel für 388 nm, BS: Strahlteiler, SM: Hohlspiegel, L1: Konvexlinse, SF: Saphir ($d = 2$ mm).

Prismenkompressor

Beim Durchlaufen der unterschiedlichen Materialien erfährt der Puls aufgrund der positiven Geschwindigkeitsdispersion in diesen Materialien eine zeitliche Verbreiterung und besitzt einen positiven Chirp. Da die Zeitauflösung des Anreg-Abtast-Experiments vor allem von der Pulsdauer abhängt, sollen die Pulse möglichst wieder komprimiert werden. Hierfür müssen Komponenten eingesetzt werden, die mit einer negativen Dispersion dem positiven Chirp entgegenwirken. Dies kann durch eine geeignete Anordnung von Gittern oder Prismen erreicht werden [45]. Eine schematische Darstellung eines solchen Prismenkompressors ist in Abbildung 2.4 gezeigt. Der einfallende Strahl wird zunächst vom ersten Prisma gebrochen. Durch Reflektion an zwei Spiegeln wird das dispergierte Licht auf ein zweites Prisma gelenkt. Dadurch erfährt der Puls einen negativen Chirp und wird so komprimiert, dass die Wegstrecken durch das Prisma und auch durch Luft nun aufgrund der Anordnung wellenlängenabhängig sind. Durch erneutes Durchlaufen des Kompressors wird dieser Effekt verstärkt und die verschiedenen spektralen Anteile werden räumlich wieder zusammengeführt. Auf dem Rückweg verläuft der Strahl unterhalb des Hinweges und kann so am Ende einfach durch einen Spiegel ausgekoppelt werden. Durch eine Variation der Wegstrecken in den Prismen und durch Luft kann die Pulsdauer optimiert werden.

Summenfrequenzerzeugung

Eine Erzeugung von Anregungspulsen mit Wellenlängen unterhalb von etwa 470 nm ist mit Hilfe des zuvor beschriebenen NOPA-Aufbaus nicht möglich. Um Pulse verschiedener Wellenlängen im UV-Bereich zu erhalten müssen weitere nichtlinear optische Prozesse angewandt werden. In dieser Arbeit wurde hierfür das Prinzip der Summenfrequenzbildung aus dem durchstimmbaren NOPA-Puls und der Laserfundamentalen ausgenutzt [46].

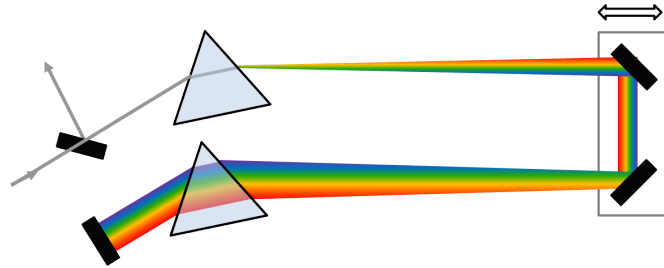


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines Kompressorbaus mit zwei Prismen. Hin- und Rückweg des Strahls verlaufen übereinander.

Hierfür wird der aus dem NOPA kommende Strahl in einen BBO-Kristall ($d = 0,1 \text{ mm}$) fokussiert und dort zeitlich und räumlich mit der fokussierten, jedoch stark abgeschwächten Laserfundamentale überlagert. Die Polarisierungen der beiden Pulse stehen parallel. Zwischen den einfallenden Strahlen besteht ein kleiner Winkel, dieser ermöglicht die einfache Abtrennung der in der Mitte auftretenden Summenfrequenz mit Hilfe einer Irisblende. Auf diese Weise können Pulse mit einer Zentralwellenlänge zwischen 290 nm und 450 nm mit hohen Pulsenergien und guter Stabilität erzeugt werden. Die Polarisation der Summenfrequenz ist senkrecht zu der der einfallenden Strahlen. Der Winkel θ zwischen der optischen Achse des nichtlinear optischen Kristalls und der Ausbreitungsrichtung des Lichts muss je nach Wellenlänge des NOPA-Pulses, bzw. des Summenfrequenz-Pulses eingestellt werden. Hierfür stehen BBO-Kristalle mit unterschiedlichen Schnittwinkeln zwischen 26° und 45° zur Verfügung. Durch eine leichte Verkippung der Kristallhalterung kann der Winkel optimal angepasst werden.

Erzeugung von Abtastpulsen im mittleren Infraroten

Für die Generierung von ultrakurzen Abtastpulsen aus einer Laserfundamentalen mit einer Zentralwellenlänge von 775 nm sind eine Reihe von nichtlinearen Prozessen notwendig: Zunächst wird Weißlicht generiert und in einem zweistufigen optisch parametrischen Verstärker werden ausgewählte Signal- und Idlerwellenlängen hochverstärkt. Anschließend werden mit ihrer Hilfe in einem Differenzfrequenzmischprozess Laserpulse im mittleren infraroten Spektralbereich erzeugt. Die Details werden im Folgenden erläutert. Der beschriebene Aufbau ist an den in Referenz [47] beschriebenen angelehnt, detailliert beschrieben in Referenz [48] und schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt.

In einem Saphirkristall ($d = 5 \text{ mm}$) wird zunächst mit Hilfe der Laserfundamentalen Weißlicht generiert. Dieses wird als Seedpuls in einen BBO-Kristall ($d = 4 \text{ mm}$, $\theta = 27^\circ$, $\phi = 30^\circ$) fokussiert und zeitlich und räumlich mit der als Pumpuls dienenden Laserfundamentalen überlagert. Die optisch parametrische Verstärkung findet hier in kollinear Anordnung statt. Dabei liegen Seed- und Pumpuls ebenso wie Signal- und Idlerpuls direkt aufeinander. Dies hat den Vorteil, dass die Verstärkung mit einer hohen Effizienz stattfindet. Ein Nachteil ist jedoch, dass die unterschiedlichen Gruppengeschwindigkeiten von Signal und Idler und die Tatsache, dass sich die beiden beim Durchlaufen

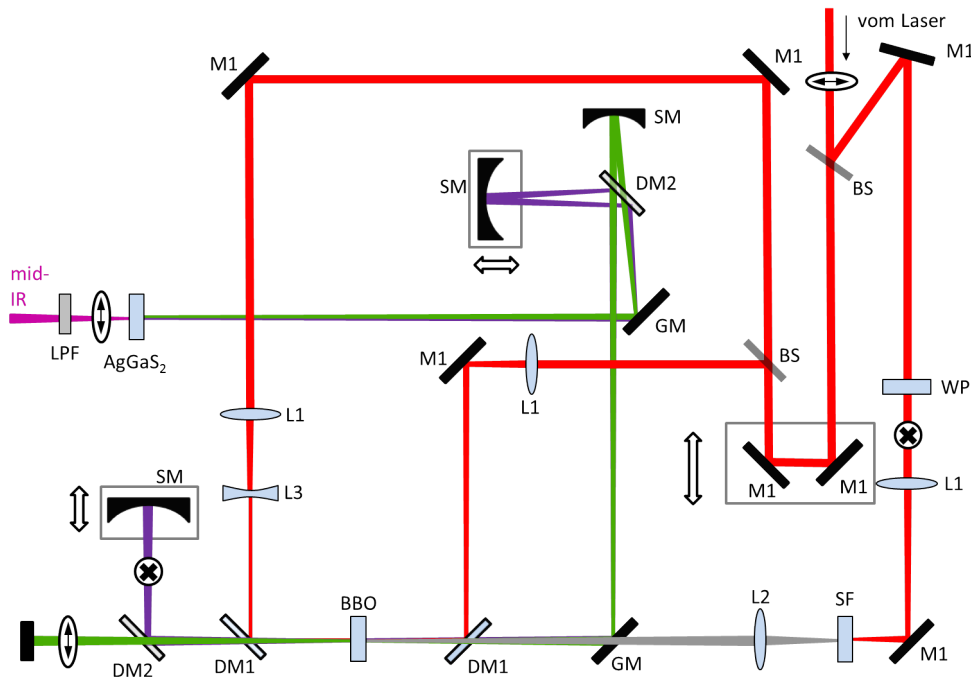


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau zur Erzeugung von Abtastpulsen im mittleren IR-Spektralbereich. Die Polarisationen sind hierbei sinnbildlich dargestellt. SF = Saphir, BS = Strahlteiler, WP = $\lambda/2$ -Platte, M1 = Fundamentalspiegel, GM = Goldspiegel, DM = Dichroitischer Spiegel, SM = Hohlspiegel, L1 = Konvexlinse, L2 = Achromat, L3 = Konkavlinse, LPF = Langpassfilter

des Mediums in Gegenwart des Pumpulses gegenseitig immer neu generieren, dazu führen, dass die Pulse zeitlich verbreitert werden. Steht der BBO-Kristall senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der einfallenden Strahlen, so erhält man Signalpulse mit einer Zentralwellenlänge von $1,3 \mu\text{m}$ und Idlerpulse von $1,9 \mu\text{m}$ Wellenlänge. Durch Verkippung des BBO-Kristalls kann die Wellenlänge von Signal- und Idlerpuls variiert werden. Der Idlerpuls wird mittels eines dichroitischen Spiegels ausgekoppelt und verworfen. Der Signalpuls wird für eine höhere Stabilität und Intensität in einem zweiten optisch parametrischen Verstärkungsprozess mit der Laserfundamentalen räumlich und zeitlich in dem BBO-Kristall überlagert. Dies geschieht räumlich etwas unterhalb der ersten Verstärkerstufe.

Die auf diese Weise erhaltenen Signal und Idler-Pulse werden nun zunächst mittels eines dichroitischen Spiegels aufgespalten um sie anschließend zeitlich in einem AgGaS_2 -Kristall zu überlagern. Dabei werden in einem Differenzfrequenzmischprozess Pulse im mittelinfraroten Spektralbereich generiert, die im Experiment als Abtastpulse fungieren. Je nach Wellenlänge der Signal- und Idlerpulse können auf diese Weise Abtastpulse mit Zentralwellenlängen zwischen $3 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ erzeugt werden. Mit Hilfe eines Germaniumbandkantenfilters werden verbleibende Signal- und Idlerstrahlen abgetrennt.

2.3.2 Anisotropie in transienten Absorptionsspektren

Die Einstrahlung von linear polarisiertem Anregungslicht auf die Probe führt dazu, dass bevorzugt die Moleküle angeregt werden, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Polarisation des Lichts ausgerichtet sind. Die Anregungswahrscheinlichkeit hängt mit dem Winkel γ zwischen dem Übergangsdipolmoment und der Polarisation des Lichts zusammen und ist proportional zu $\cos^2 \gamma$. Die gleichen Überlegungen können auf das linear polarisierte Abtastlicht angewendet werden. Somit hängen die gemessenen transienten Absorptionsänderungen von der relativen Polarisation von Anregungs- und Abtastlicht ab und der Lage der jeweils betrachteten Übergangsdipolmomente zueinander. Verändert sich die Ausrichtung der Dipolmomente während des betrachteten Zeitraums, so kann diese Änderung mit Hilfe einer polarisationsabhängigen Messung betrachtet werden. Durch Rotation der Moleküle wird die erzeugte Anisotropie der Verteilung angeregter Moleküle zerstört. Dies spielt vor allem bei der Untersuchung kleiner Moleküle eine Rolle, für große Proteine ist dieser Effekt im betrachteten Zeitbereich vernachlässigbar, da sie nur langsam rotieren [49]. Als Maß für die Richtungsabhängigkeit wird der Anisotropieparameter r verwendet. Er kann aus den Absorptionsänderungen mit paralleler (ΔA_{\parallel}) und senkrechter (ΔA_{\perp}) Ausrichtung der Polarisationen von Anregungs- und Abtastlicht bestimmt werden.

$$r = \frac{\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp}}{\Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp}} \quad (2.19)$$

Der Anisotropieparameter lässt sich auch aus der molekularen Geometrie ableiten.

$$r = \frac{1}{5}(3 \cos^2 \theta - 1) \quad (2.20)$$

Wobei θ den Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten des angeregten und abgetasteten Zustands angibt. Sind beide parallel zueinander ausgerichtet ($\theta = 0^\circ$) so erhält man für r einen Wert von 0,4. Stehen sie senkrecht zueinander ($\theta = 90^\circ$) erhält man $r = -0,2$. Für alle anderen Winkel bewegen sich die Werte für r zwischen diesen beiden Werten.

Möchte man einen Einfluss der Rotationsdiffusion der Moleküle auf die Messergebnisse vermeiden, so können die Polarisationen von Anregungs- und Abtastpuls in einem Winkel von $\theta_{ma} = 54,7^\circ$, dem sogenannten magischen Winkel, ausgerichtet werden. In diesem Fall heben sich die polarisationsabhängigen Beiträge gerade auf und $r = 0$. Dieses isotrope Signal kann alternativ auch aus den Werten für die anisotropen Messungen berechnet werden.

$$\Delta A_{ma} = \frac{1}{3}(\Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp}) \quad (2.21)$$

Nach Gleichung 2.20 können aus den experimentell ermittelten Anisotropieparametern Informationen über die Molekülgeometrien gewonnen werden. Dabei müssen jedoch einige Randbedingungen beachtet werden: Rückschlüsse auf den Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten sind nur dann legitim, wenn die Signale einzelnen Banden zuzuordnen sind und es sich nicht um die Überlagerung mehrerer Oszillatoren handelt.

Weiterhin muss die Flexibilität der Moleküle beachtet werden. Ein berechneter Wert von $\theta = 54,7^\circ$ kann beispielsweise bedeuten, dass tatsächlich dieser Winkel vorliegt, oder dass es sich um eine vollständig isotrope Verteilung handelt.

2.3.3 Transiente Absorption im UV/vis

Anreg-Abtast-Spektroskopie mit Abtastpulsen im UV/vis-Spektralbereich erlaubt die Betrachtung der transienten Absorptionsänderungen eines Chromophors nach Photoanregung. Mit Hilfe dieser Methode kann z. B. der Schaltvorgang eines Photoschalters oder das transiente Absorptionsverhalten eines Chromophors in einer Proteinbindetasche nach Photoanregung verfolgt werden. Möglich ist beispielsweise auch die Betrachtung eines Chromophors, der durch den Anregungspuls nicht direkt angeregt wurde, dies kann beispielsweise genutzt werden um den Energieübertrag von Fucuxanthin auf Chlorophyll in Fucuxanthin-Chlorophyll-Proteinen zu untersuchen [50].

Für die transienten Messungen mit Abtastlicht im UV/vis-Spektralbereich werden zunächst mit Hilfe der bereits beschriebenen nichtlinearen Prozesse Pulse mit der benötigten Anregungswellenlänge erzeugt. Über einen Retroreflektor, der sich auf einem schrittmotorgesteuerten Verschiebetisch befindet, kann der Anregungspuls zeitlich gegenüber dem Abtastpuls verzögert werden. Mit Hilfe eines Off-Axis-Parabolspiegels wird der Anregungsstrahl schließlich in der Probe fokussiert. Der Fokaldurchmesser beträgt dabei etwa $100 \mu\text{m}$.

Weißlichtpulse, die zur Abtastung der Probe genutzt werden, werden wie bereits beschrieben in einem Saphir- ($d=2 \text{ mm}$) oder CaF_2 -Substrat ($d=2,3 \text{ mm}$) erzeugt. Mit Hilfe eines Strahlteilers werden sie in einen Signal- und einen Referenzteil aufgespalten. Der Referenzteil durchläuft nicht die Probe, sondern wird zur Vermeidung der Einwirkung weiterer Rauschquellen wie beispielsweise Streulicht direkt in ein Spektrometer geleitet und detektiert. Der Signalteil dient als Abtastpuls und wird auf die Probe fokussiert und dort räumlich mit dem Anregungspuls überlagert. Auch hier beträgt der Fokaldurchmesser etwa $100 \mu\text{m}$. Nach Passieren der Probe wird der Signalteil ebenfalls in ein Spektrometer geleitet und anschließend detektiert. Die spektrale Auflösung beträgt in beiden Fällen 8 nm und die Detektion erfolgt jeweils mit Hilfe eines 42-Kanal-Photodiodenzeilenarrays. Über einen 96-Kanal-Analog/Digital-Wandler werden die gemessenen Spannungen (N) im Einzelschussbetrieb ausgelesen und an einen Messcomputer weitergegeben [51]. Da die zu erwartenden Effekte deutlich kleiner sind als die Absorption der entsprechenden Probe werden nicht absolute Absorptionen sondern Absorptionsänderungen zur transienten Charakterisierung der Probe genutzt. Hierfür werden ein Abtastpuls mit und einer ohne Anregung miteinander verrechnet.

$$\Delta A(t, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{N(t, \lambda)}{N(t, \lambda)_{block}} \right) \quad (2.22)$$

wobei $N(t, \lambda)$ die gemessene Spannung mit, $N(t, \lambda)_{block}$ ohne Anregungspuls ist. Man erhält auf diese Weise Absorptionsänderungen ΔA der Probe. Um eine Auswirkung

von Langzeitschwankungen des verwendeten Aufbaus auf die Messungen zu vermeiden sollten die Messungen mit und ohne Anregungspuls möglichst direkt hintereinander erfolgen. Neben der Verwendung eines Signal- und eines Referenzpulses, um spektrale und Intensitäts-Schwankungen in den einzelnen Abtastpulsen ausgleichen zu können, gibt es noch weitere Möglichkeiten, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messungen zu verbessern. Um Effekte durch Streulicht eliminieren zu können wird zur weiteren Korrektur eine Messung ohne Abtastpuls aber mit Anregungspuls gemessen. Dies verbessert die Qualität der Signale vor allem im Bereich der Anregungswellenlänge erheblich. Um die Messung von Differenzspektren und die Streulichtkorrektur durchführen zu können, wird die in Abbildung 2.6 gezeigte Pulsabfolge genutzt. Realisiert wird diese mit Hilfe rotierender Schlitzscheiben (*sog. Chopper*), die zeitlich mit dem Lasersystem korreliert sind und einen Teil der Pulse abblocken.

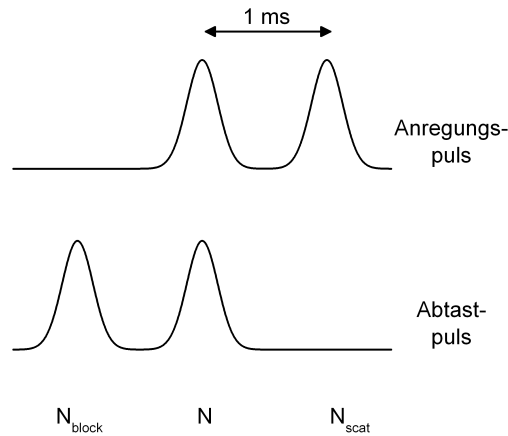


Abbildung 2.6: Für die Anreg-Abtast-Experimente mit Abtastpuls im UV/vis-Spektralbereich verwendete Pulsfolge. N_{block} steht für die gemessene Spannung ohne Anregungspuls, N steht für die gemessene Spannung mit Anregungspuls und N_{scat} stellt das gemessene Signal mit Anregungs- aber ohne Abtastpuls dar und dient der Korrektur von Streulichteinflüssen.

Große Schwankungen in den gemessenen Signalstärken werden mit Hilfe von vorgegebenen Grenzwerten erkannt und in der Auswertung nicht berücksichtigt. mit Hilfe der eingeführten Korrekturen werden die transienten Absorptionsänderungen folgendermaßen berechnet:

$$\Delta A = -\log_{10} \left[\left(\frac{N(t, \lambda)_{sig} - N(t, \lambda)_{sig,scat}}{N(t, \lambda)_{ref} - N(t, \lambda)_{ref,scat}} \right) \cdot \frac{N(t, \lambda)_{ref,block}}{N(t, \lambda)_{sig,block}} \right] \quad (2.23)$$

Um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, werden für jeden Messpunkt etwa 1000 Laserpulse gemittelt. Außerdem werden für eine komplette Messung mehrere Durchläufe durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung des verwendeten Aufbaus findet sich auch in der Referenz [51].

Da der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen 1 ms beträgt, die zu beobachtende Reaktion aber länger dauern kann oder sogar irreversibel abläuft, ist es notwendig das Probenvolumen innerhalb dieser Zeitspanne auszutauschen. Dies kann entweder durch ein Durchpumpen der Probelösung durch die Küvette geschehen, dies ist vor allem bei Proben mit sehr langen Photozyklen oder irreversiblen Reaktionen notwendig, oder, wie in dieser Arbeit geschehen, durch laterale Bewegung der Küvette mit der entsprechenden Geschwindigkeit.

Die Einstellung und Optimierung des räumlichen Überlapps von Anregungs- und Abtastpuls in der Probe erfolgt mit Hilfe von Lösungen bekannter Farbstoffe oder von Quantenpunkten, die an der späteren Probenposition in einer baugleichen Küvette in den Strahlengang gebracht werden. Dabei wird das bekannte transiente Differenzsignal der jeweiligen Testsubstanz auf möglichst hohe Intensitäten optimiert. Aus dem transienten Verlauf der Messung an der Testsubstanz kann auch der Zeitnullpunkt der Messanordnung, also der zeitliche Überlapp von Anregungs- und Abtastpuls ermittelt werden. Es wird dabei davon ausgegangen, dass der Signalanstieg am Zeitnullpunkt mit einer durch die Kreuzkorrelationszeit ausgeschmierten Errorfunktion beschrieben werden kann. Der Zeitnullpunkt der Messanordnung ist durch den Wendepunkt dieser Funktion gegeben.

Effekte am Zeitnullpunkt

Aufgrund der Wechselwirkung der elektrischen Felder von Anregungs- und Abtastpuls am Zeitnullpunkt werden kohärente Effekte beobachtet. Zudem führt der Chirp des Abtastpulses dazu, dass der Zeitnullpunkt eine Wellenlängenabhängigkeit aufweist. Diese Effekte sowie Möglichkeiten zur Korrektur werden im Folgenden vorgestellt.

Kohärente Effekte

Durch die Wechselwirkung von Anregungs- und Abtastpuls treten um den Zeitnullpunkt kohärente Effekte auf, die häufig sehr intensiv sind und die eigentlichen Probensignale überdecken. Die wichtigsten Effekte sind hierbei Zweiquantenabsorptionen, Kreuzphasenmodulation und impulsive stimulierte Ramanstreuung [52–55]. Diese kohärenten Effekte treten auch im Lösungsmittel und dem Küvettenmaterial auf, die den Großteil der beobachteten Kohärenzen ausmachen. Zur Korrektur wird daher ein transientes Spektrum des Lösungsmittels unter den identischen Versuchsbedingungen aufgenommen, das vom Signal der Probenmessung abgezogen wird. Das Spektrum wird auf diese Weise von Signalen, die nicht von der Probensubstanz stammen bereinigt.

Dispersion des Zeitnullpunkts

Beim Durchgang des spektral breiten Abtastpulses durch unterschiedliche Medien, z. B. Glas, Lösungsmittel aber auch Luft, erfährt dieser eine positive Dispersion. Die Spektralanteile des Pulses erreichen die Probe zu verschiedenen Zeiten. Dies führt dazu, dass der Zeitnullpunkt der Messung wellenlängenabhängig wird. Zur Korrektur kann entweder das kohärente Artefakt der Lösungsmittelmessung oder der Signalanstieg in

den Messungen der Testsubstanz, die für die Einstellung des Überlapps genutzt wurde, verwendet werden. Dabei wird die Lage des Zeitnullpunkts zunächst anhand der Signale für jede einzelne Wellenlänge abgeschätzt. Die Lage des Zeitnullpunkts kann nun gegen die Wellenlänge aufgetragen werden. Nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz herrscht zwischen der Lichtgeschwindigkeit in einem Medium c_M und dem Brechungsindex n_g folgender Zusammenhang:

$$n = \frac{c}{c_M} \quad (2.24)$$

Die Abhängigkeit des Brechungsindex n von der Wellenlänge λ kann wiederum mit der von Sellmeier entwickelten semiempirischen Formel beschrieben werden [56].

$$n^2 = 1 + \sum_j \frac{A_j \lambda^2}{\lambda^2 - B_j} \quad (2.25)$$

A_j und B_j sind dabei materialabhängige Konstanten. Mit Hilfe dieser beiden Formeln kann die Dispersion des Zeitnullpunkts beschrieben und die Kurve entsprechend gefittet werden. Die Fitfunktion beschreibt nun den Chirp des Abtastpulses und kann zur Korrektur der gemessenen Daten verwendet werden.

2.3.4 Transiente Absorption im mittleren Infraroten

Je nach Art der zu untersuchenden Probe kann es erforderlich sein, dass nicht das transiente Verhalten eines Chromophors nach einer Photoanregung untersucht werden soll, sondern eines Abschnitts des Moleküls, der nicht im UV/vis-Spektralbereich absorbiert. Möchte man beispielsweise untersuchen, wie ein Protein auf die Anregung eines gebundenen Chromophors reagiert, so ist es von Vorteil direkt die Strukturänderungen im Protein verfolgen zu können. Eine struktursensitive Methode, mit deren Hilfe beispielsweise Informationen über das Peptidrückgrat eines Proteins gewonnen werden können stellt die Spektroskopie im mittleren infraroten Spektralbereich dar. Durch transiente Spektroskopie mit einem Anregungspuls im UV/vis-Bereich und Abtastpulsen im mittleren Infraroten können z. B. Strukturänderungen in Retinalproteinen [57] oder in Modellpeptiden, in deren Rückgrat photoschaltbare Moleküle eingebracht wurden [58, 59], untersucht werden. Für die Experimente mit sichtbarem Anregungspuls und einem Abtastpuls im mittleren Infraroten wurde der von K. Neumann im Rahmen seiner Dissertation aufgebaute IRMA-Aufbau (**I**nfrarot **M**essanlage) verwendet. Dieser wird im Folgenden kurz vorgestellt und ist ausführlich in der Referenz [48] beschrieben, ebenso wie das verwendete Messprogramm. Außerdem werden Effekte aufgezeigt, die in der transienten Absorptionsspektroskopie mit Abtastlicht im mittleren Infraroten eine wichtige Rolle spielen.

Messaufbau

Zunächst werden die Wellenlängen der Anregungs- und Abtastpulse mit Hilfe entsprechender nichtlinear optischer Prozesse konvertiert, wobei der Anregungspuls im

UV/vis-Bereich und der Abtastpuls im mittleren IR-Bereich liegt. Die zeitliche Verzögerung zwischen Anregungs- und Abtastpuls wird bei dem verwendeten IRMA-Experiment durch eine Veränderung der Weglänge des Abtast-Pulses erreicht. Dieser läuft hierfür zweifach gefaltet über einen verfahrbaren Linearverschiebetisch. Für die Messung der angeregten Probe relativ zur nicht angeregten Probe wird jeder zweite Puls mit Hilfe eines Choppers abgeblockt. Auf diese Weise werden Differenzspektren gemessen, die erlauben, selbst kleine Absorptionsänderungen in der Probe zu beobachten. Mit Hilfe von Parabolspiegeln werden Anregungs- und Abtaststrahl auf die Probe fokussiert, wobei der Winkel zwischen beiden für einen möglichst großen räumlichen Überlapp möglichst klein sein sollte. Dies wird durch eine Bohrung im Gold-Parabolspiegel für den Abtastpuls ermöglicht, durch den der Anregungspuls geführt wird.

Bevor der Abtastpuls die Probe erreicht wird jedoch mit Hilfe eines gekeilten CaF_2 -Plättchens ein zweiter Abtastpuls erzeugt. Dieser besitzt keinen Überlapp mit dem Anregungspuls und dient in den Messungen als Referenz. Analog zu den Messungen im sichtbaren Spektralbereich dient er zur Eliminierung kurzzeitiger Schwankungen und somit der Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Nach der Probe werden Abtast- und Referenzstrahl mit Hilfe eines weiteren Parabolspiegels kollimiert und anschließend in das Spektrometer fokussiert. Dort werden sie über ein Gitter spektral divergiert. Die Detektion und Digitalisierung findet mit Hilfe eines Boxcar-Integratorsystems mit Analog/Digital-Wandler (Infrared Systems Development Corp., IR-6416 Multichannel Laser Pulse Spectroscopy System) statt. Dazu wird der divergierte Puls auf ein 64-elementiges HgCdTe-Detektorarray fokussiert, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Die Elemente liegen dabei als Doppelzeile vor, wobei 32 der Detektion des Abtastpulses und 32 der des Referenzpulses dienen. Das Signal wird vorverstärkt, integriert, anschließend über einen 16-Bit-Analog/Digital-Wandler digitalisiert und mit Hilfe eines Computers weiterverarbeitet. Für das verwendete Gitter (150 Linien/mm) wird eine spektrale Auflösung von 11,3 nm/Kanal erreicht.

Der gesamte Bereich mit Verzögerungsstrecke, Probe und Spektrometer wird mit trockener CO_2 -freier Luft gespült. Dies ist notwendig, da H_2O und CO_2 in der Gasphase starke Absorptionsbanden im mittleren infraroten Spektralbereich aufweisen. Dies führt zum einen zu einer Verringerung der Intensität, zum anderen wird der Puls aufgrund der schmalen Absorptionsbanden zeitlich "zerschnitten", so dass mehrere Abtastpulse hintereinander die Probe erreichen. Die Luftfeuchtigkeit im Messbereich wird mit Hilfe eines Taupunktsensors kontrolliert und die Messung erst bei Taupunkten unterhalb von -30°C gestartet.

Zur Datenaufnahme wird das von K. Neumann entwickelte, auf LabView basierende Programm FIST (engl. femtosecond infrared spectroscopy toolkit) verwendet. Für jede Verzögerungszeit werden für jeden der 32 Kanäle N Laserpulse detektiert und vom Messrechner aufsummiert. N liegt dabei in der Größenordnung von einigen tausend. Vor jedem Messdurchlauf werden die Dunkelstromsignale aufgenommen, während der gesamte Strahlengang mittels eines Shutters geblockt wird, die Anschließend von allen Messsignalen dieses Messdurchlaufs abgezogen werden. Aus den Messungen der Intensitäten mit und ohne Pumpuls des Abtast- und des Referenzpulses ergibt sich die

Absorptionsänderung folgendermaßen:

$$\Delta A(t, \lambda) = -\log_{10} \left[\frac{\bar{I}_{sig}(t, \lambda)}{\bar{I}_{sig,block}(t, \lambda)} \cdot \frac{\bar{I}_{ref,block}(t, \lambda)}{\bar{I}_{ref}(t, \lambda)} \right] \quad (2.26)$$

wobei, in Analogie zu den Experimenten mit Abtastpulsen im UV/vis, \bar{I}_{sig} und \bar{I}_{ref} die gemittelten Intensitäten für den Abtast- und den Referenzpuls mit Anregung und \bar{I}_{sig} und \bar{I}_{ref} ohne Anregung darstellen.

Verschiedene digitale Filter erlauben das Erkennen und Aussortieren von einzelnen Laserschüssen, die zu Abweichungen führen. Neben einem Filter, der die Einhaltung bestimmter Grenzen der gemessenen Intensitäten überwacht, gibt es weitere Filter, die kleinere Abweichungen registrieren und die entsprechenden Laserschüsse aussortieren. Durch diese Filter wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messungen erheblich verbessert. Dies ermöglichte auch die Messung von Daten, trotz Ausfalls einiger Elemente in der Referenz-Detektorzeile, wodurch die Messungen unreferenziert durchgeführt werden mussten.

Der räumliche Überlapp von Anregungs- und Abtastpuls wird zunächst mit Hilfe einer Lochblende grob eingestellt. Für die Optimierung und die Festlegung des Zeitnullpunkts wird zunächst ein Halbleitersubstrat anstelle der Probe in den Strahlengang gebracht. Dieses absorbiert breitbandig Licht, dessen Energie größer als die Bandlücke ist, wodurch Elektronen ins Leitungsband gehoben werden. Im Leitungsband steht den freien Ladungsträgern ein Kontinuum an Energiezuständen zur Verfügung, woraus eine Absorptionzunahme über einen breiten Spektralbereich resultiert, der im mittleren Infraroten liegt. Für Silizium beobachtet man ein Differenzsignal, das einige Nanosekunden andauert. Es dient zur Grobeinstellung des Zeitnullpunkts. Das Differenzsignal von Zinkselenid ist nur einige Pikosekunden zu sehen, durch den schnelleren Signalanstieg eignet es sich jedoch zur Feineinstellung des zeitlichen Überlapps. Die über alle Kanäle gemittelte Absorptionzunahme kann mit Hilfe einer Fehlerfunktion beschrieben werden, deren Wendepunkt dem Zeitnullpunkt entspricht (vergleiche Formel 2.29 in Kapitel 2.3.5). Aus der ersten Ableitung dieser Kurve erhält man direkt die Kreuzkorrelationsfunktion, an die eine Gaußfunktion angenähert werden kann. Aus den Parametern dieser Funktion können die Kreuzkorrelationsbreite sowie der Zeitnullpunkt mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

Auch bei den transienten Messungen mit Abtastpulsen im mittleren Infraroten muss für jeden Laserschuss ein frisches Probevolumen bereit gestellt werden. Dies kann entweder mittels Durchpumpen der Probe durch eine Küvette oder, wie in den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen, durch eine Bewegung der Probe erreicht werden. Die Küvette besteht hierbei aus zwei CaF_2 -Fenstern, zwischen denen sich ein $50 \mu\text{m}$ dicker Teflonring als Abstandshalter befindet. Durch Rotation der Küvette bei gleichzeitiger Translation der gesamten Küvettenhalterung mit ausreichender Geschwindigkeit wird der Probenaustausch zwischen zwei Laserschüssen (innerhalb 1 ms) gewährleistet.

Für die polarisationsabhängigen Messungen kann der Winkel zwischen den Polarisierungen des Anregungs- und des Abtaststrahls mit Hilfe einer im Anregungsstrahl

befindlichen schrittmotorgesteuerten Optikhalterung eingestellt werden, in der sich eine für die Anregungswellenlänge passende $\lambda/2$ -Verzögerungsplatte befindet. Sie ermöglicht eine Messung der gewünschten Polarisierungen nahezu zeitgleich unter identischen Bedingungen und gewährleistet somit eine gute Vergleichbarkeit der Datensätze.

Rückbelichtung

Einige Experimente erfordern während der Messung eine kontinuierliche Belichtung zur Einstellung und Erhaltung eines photostationären Gleichgewichts. Eine spezielle Halterung ermöglicht eine Belichtung der Probe während der Messung, wobei das Licht mit Hilfe eines Lichtleiters (Glasfaserbündel) auf die Probe gelenkt wird. Das Licht einer UV-Lampe (HeXe-Dampfampe, Hamamatsu, Typ LC4) wird hierbei durch eine Kombination aus Farbglasfiltern, die sich in einem Wasserbad befinden, gefiltert und über eine Linse in den Lichtleiter eingekoppelt. Je nach Auswahl der Filter können unterschiedliche Banden der eingesetzten Lampe separiert werden. Die Spektren ohne sowie mit den in dieser Arbeit verwendeten Filterkombinationen ist in Abbildung 2.7 gezeigt. Durch den Einsatz der Filterkombination aus BG3- und GG420-Filter kann die Emissionsbande um 365 nm separiert werden, mit den Filtern UG1 und WG420 erhält man die Bande um 436 nm.

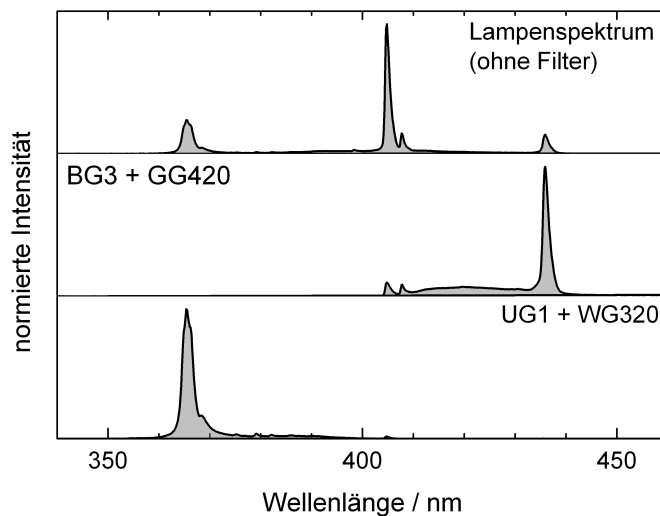


Abbildung 2.7: Spektren der UV-Lampe, die für die Belichtung der Proben verwendet wurde ohne und mit den jeweils verwendeten Filterkombinationen.

Die selbe Anordnung aus Lampe, Filtern, Linse und Lichtleiter wird auch für die Belichtung der Proben zur statischen Charakterisierung eingesetzt.

Effekte in fs-IR-Messungen

Ähnlich wie bei Anreg-Abtast-Experimenten mit Abtastpulsen im UV/vis-Spektralbereich treten auch bei Experimenten mit Abtastpulsen im mittelinfraroten Spektralbereich kohärente Effekte um den Zeitnullpunkt auf. Die wichtigsten werden im Folgenden vorgestellt.

Gestörter freier Induktionszerfall

Bei Anreg-Abtast-Experimenten mit sichtbarem Anregungs- und infrarotem Abtastpuls treten häufig auch bei negativen Verzögerungszeiten (d. h. der Anregungspuls erreicht die Probe nach dem Abtastpuls) Differenzsignale auf. Die Ursache hierfür ist der sogenannte gestörte freie Induktionszerfall (PFID, engl. **p**erturbed **f**ree **i**nduction **d**ecay) [60, 61]. Durch den Abtastpuls, der energetisch einem molekularen Übergang entspricht, wird in der Probe eine kohärente Polarisation erzeugt, wodurch das Licht absorbiert wird. Die erzeugte Polarisation zerfällt mit der Dephasierungszeit T_2 unter der Abstrahlung von Licht. Dieser Prozess wird als freier Induktionszerfall bezeichnet. T_2 ist umgekehrt proportional zur spektralen Breite $\Delta\tilde{\nu}$ der Absorptionsbande.

$$T_2 = \frac{1}{\pi c \Delta\tilde{\nu}} \quad (2.27)$$

Je schmaler also die Absorptionsbande ist, desto länger ist die Dephasierungszeit. Aus einer typischen IR-Absorptionsbande mit einer Bandenbreite von 10 cm^{-1} ergibt sich so eine Dephasierungszeit im Pikosekundenbereich, also deutlich länger als die Dauer der verwendeten Anregungs- und Abtastpulse im Experiment. Im sichtbaren Spektralbereich sind die Absorptionsbanden deutlich breiter, was zu kürzeren Dephasierungszeiten führt, so dass der Effekt bei Abtastpulsen im UV/vis-Bereich zu vernachlässigen ist.

Erreicht der Anregungspuls die Probe während sie noch aufgrund des freien Induktionszerfalls emittiert, so verursacht dies eine Änderung der Absorptionsfrequenz der Schwingung. Der freie Induktionszerfall wird gestört. Dies ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt. Am Dektector wird nun bei Anwesenheit des Anregungspulses eine veränderte integrale Intensität gemessen und ein Differenzsignal zu negativen Verzögerungszeiten ausgegeben.

Aus den PFID-Signalen kann man die spektrale Lage und die Breite von Absorptionsbanden bestimmen, die direkt durch die Absorption des Anregungspulses beeinflusst werden.

Kohärente Absorption von Gasen

Die schmalen Absorptionsbanden der in Luft enthaltenen Gase wie H_2O oder CO_2 führen zu einem veränderten Spektrum und zeitlichen Verlauf des infraroten Abtastpulses. Zudem wird in den Gasteilchen durch Absorption eine kohärente Polarisation induziert, und damit ein freier Induktionszerfall. Die hierbei emittierte Strahlung kann mit anderer an unterschiedlichen Orten zu unterschiedlichen Zeiten emittierten Strahlung interferieren und wieder absorbiert werden, dies führt zu sehr komplexen Pulszügen. Die schmalen

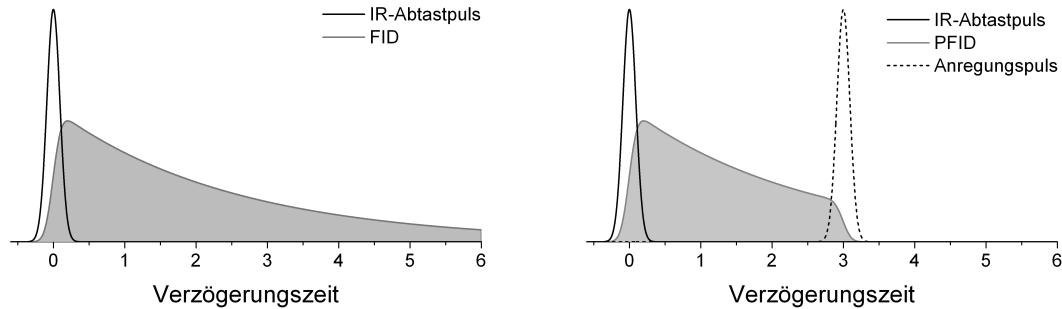


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des freien Induktionszerfalls (links) und des gestörten freien Induktionszerfalls (rechts). Gezeigt sind jeweils die Amplituden der elektrischen Felder. Erreicht der Anregungspuls die Probe nach dem Abtastpuls so wird die zerfallende kohärente Polarisation durch ersteren gestört.

Banden der Rotationsschwingungsübergänge besitzen eine entsprechend lange Dephasierungszeit, die zu einer Verzerrung der Pulse um einige zehn Pikosekunden führen kann. Durch Spülen des Messbereichs, der nahezu die gesamte Strecke des mittelinfraroten Pulses (ab der Differenzfrequenzerzeugung) beinhaltet, mit trockener CO_2 -freier Luft können diese Effekte weitgehend vermieden werden.

Fabry-Pérot-Etalon-Effekt

Bei der Messung von nicht anti-reflex-beschichteten Halbleitersubstraten kommt es zu einer Reflektion eines erheblichen Anteils des Abtastlichts an den Oberflächen. Dies führt wiederum je nach Wellenlänge zu positiven und negativen Interferenzen, ähnlich denen, die für ein Fabry-Pérot-Etalon beobachtet werden. Aus Mehrfachreflexionen resultieren kleine, zeitlich zum eigentlichen Abtastpuls verzögerte Infrarotpulse, deren Zeitauflösung abhängig ist von dem Brechungsindex, der Materialdicke und dem Einfallswinkel. Bei den untersuchten Proben ist dieser Effekt in den Spektren nicht zu beobachten, da die Verluste durch Reflektion von der Änderung des Brechungsindex abhängen. Dieser ist für die verwendeten Materialien zu vernachlässigen.

Kreuzphasenmodulation

Bei räumlicher und zeitlicher Überlagerung können durch die Wechselwirkung der beiden Pulse in den verwendeten Materialien Signale auftreten, die allgemein als kohärentes Artefakt bezeichnet werden. Im mittelinfraroten Spektralbereich kann dieses Artefakt am Zeitnullpunkt auf die Kreuzphasenmodulation (XPM, engl. **cross phase modulation**) zurückgeführt werden, die auf dem optischen Kerr-Effekt basiert [62, 63]. Der intensive Anregungspuls bewirkt dabei eine Veränderung des Brechungsindex. Während der Kreuzkorrelationszeit, wenn der Abtastpuls mit dem Anregungspuls zeitlich überlappt, erfährt der spektral breite Abtastpuls eine Phasenverschiebung, woraus ein verändertes

Spektrum resultiert. Dies führt zu Differenzsignalen um den Zeitnullpunkt. In Abbildung 2.9 ist eine 2D-Darstellung eines typischen XPM-Signals sowie der transiente Verlauf bei einzelnen Wellenzahlen gezeigt. Der Effekt kann durch eine Verringerung der Anregungsintensität oder Messung mit senkrechter Polarisation der beiden Strahlen zueinander verringert werden, was jedoch häufig aufgrund der Probe und der Messanforderungen nicht möglich ist. Eine Korrektur durch Subtraktion des Lösungsmittelsignals hat sich bei den in dieser Arbeit gemessenen kleinen Differenzsignalen der Probe als nicht sinnvoll erwiesen. Ein Einfluss der Probe auf die Pulse sowie auf den Brechungsindex kann vermutlich nicht vernachlässigt werden. Die Überlagerung mit dem PFID-Effekt erschwert zusätzlich die Korrektur der Daten. Die quantitative Auswertung wurde daher auf den Zeitbereich nach der Kreuzphasenmodulation beschränkt.

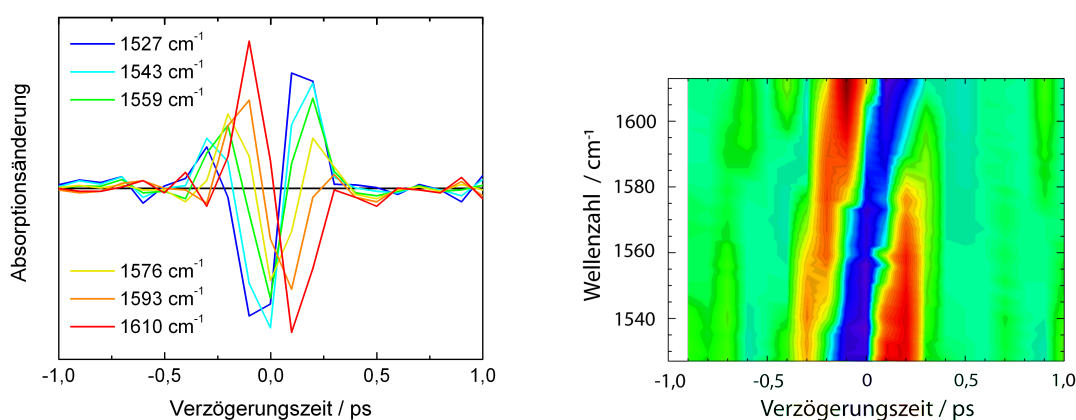


Abbildung 2.9: Kreuzkorrelationssignal von D₂O in einer CaF₂-Küvette. Gezeigt sind die transienten Absorptionsänderungen bei einzelnen Wellenzahlen (links), sowie eine Übersichtsdarstellung (rechts). Die Absorptionsänderungen sind dabei farbcodiert: rot = positive, blau = negative, grün = keine Absorptionsänderungen.

2.3.5 Datenauswertung

Die erhaltenen transienten Messdaten aus den Anreg-Abtast-Experimenten mit Abtastpulsen im UV/vis- und IR-Spektralbereich werden mit Hilfe der auf IDL 6.0 basierenden Software *z20* ausgewertet [35]. Die Daten der einzelnen Messdurchläufe können zunächst in das Unterprogramm *ik-mittel* eingeladen werden. Hier kann eine Auswahl der Messdurchläufe getroffen und gemittelt werden. Die gemittelten Daten werden in das zweite Unterprogramm *nk-view* eingelesen. In diesem können die Korrekturen der kohärenten Artefakte und des Zeitnullpunkts durchgeführt werden. Die korrigierten Daten können nun im dritten Unterprogramm *multiview* eingelesen werden. Dieses Unterprogramm erlaubt die Darstellung von transienten Spektren zu bestimmten Verzögerungszeiten, die Betrachtung von Zeitverläufen der Messung bei einzelnen Abtastwellenlängen, die Erzeugung von 2D- und 3D-Darstellungen sowie von Filmen, die den zeitlichen Verlauf

der Absorptionsänderungen dokumentieren. Außerdem können die Daten hier einer globalen Fitanalyse unterzogen werden.

Globale Fitanalyse

Bei der globalen Fitanalyse werden die transienten Daten über ein Ratenmodell dargestellt, wobei davon ausgegangen wird, dass die Probe n unterschiedliche Zustände annehmen kann, deren Besetzungszahlen zeitabhängig sind. Die Daten lassen sich dann durch eine Überlagerung von Exponentialfunktionen beschreiben. Aufgrund der zeitlichen Breite von Anregungs- und Abtastpuls muss noch die Kreuzkorrelationsbreite berücksichtigt werden. Für die transiente Absorptionsänderung ergibt sich so folgende Gleichung:

$$\Delta A(t, \lambda) = \sum_i a_i(\tau_i \lambda) \cdot \exp\left(\frac{t_{CC}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t}{\tau_i}\right) \cdot \frac{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t}{t_{CC}} - \frac{t_{CC}}{2\tau_i}\right)}{2} \quad (2.28)$$

Hierbei ist t_{CC} die Kreuzkorrelationsbreite, τ_i ist die i -te Zeitkonstante und erf ist die sogenannte Fehlerfunktion (eng. **error function**).

$$\operatorname{erf} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^x \exp(-t^2) dt \quad (2.29)$$

Der Gewichtungsfaktor a_i dient der Bildung der zerfallassozierten Spektren (DAS, engl. **d**ecay **a**ssociated **s**pectrum) der jeweiligen Zeitkonstante und gibt somit Auskunft darüber, welche Zeitkonstanten bei welchen Wellenlängen dominieren. Bei der globalen Fitanalyse erfolgt die Anpassung für alle Messkanäle (Wellenlängen) gleichzeitig. Dies geschieht mit Hilfe eines am Institut für Medizinische Optik, Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelten URMEL-Algorithmus. Das Programm bestimmt den besten Satz an Zerfallszeiten τ_i und Amplituden a_i auf der Grundlage der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Die Anzahl der Zeitkonstanten muss dabei vorgegeben werden [35].

3 Flavine und Flavoproteine

3.1 Flavine

Flavine spielen in einer Reihe biologischer Prozesse eine wichtige Rolle als Überträger von ein oder zwei Elektronen bzw. als Lichtrezeptoren. Als Grundbaustein besitzen alle Flavine eine aromatische Isoalloxazineinheit an deren N10-Atom je nach Flavin unterschiedliche Reste angebracht sind (Abbildung 3.1).

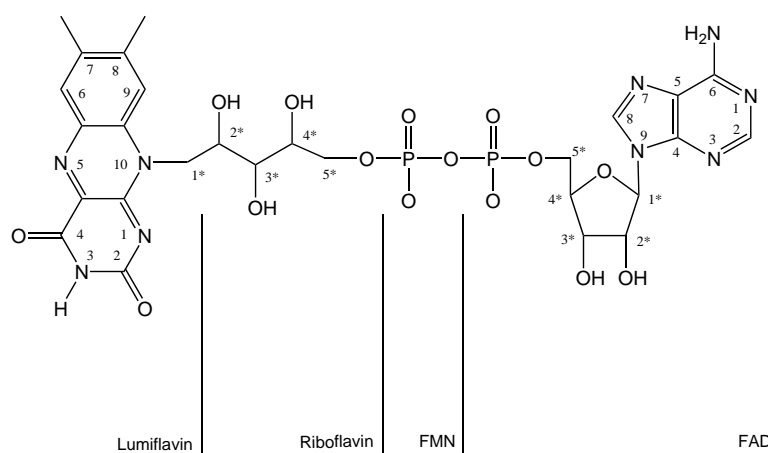


Abbildung 3.1: Struktur der physiologisch wichtigen Flavine Riboflavin, FMN und FAD sowie des kleinsten Flavins Lumiflavin mit einer Methylgruppe an der N10-Position.

Biologisch relevante Flavine sind vor allem Riboflavin (Vitamin B₂, Rf), Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadeninucleotid (FAD). Das kleinste Flavin ist Lumiflavin mit einer Methylgruppe als Rest, diese ist mindestens notwendig um eine Isomerisierung der Isoalloxazineinheit zu verhindern. Substituiert man sie durch ein Wasserstoffatom, so liegt das Molekül (Lumichrom, Lc) in der stabileren Alloxazinform vor (Abbildung 3.2). Diese besitzt andere elektronische Eigenschaften als das Isoalloxazin und zeichnet sich nicht durch katalytische Aktivität aus. Die veränderte Elektronenverteilung sorgt auch für einen Verlust der gelben Farbe, die namensgebend für die Flavine ist (lat: *flavus* = gelb), weshalb die Alloxazin-Systeme nicht als Flavine bezeichnet werden. Die Lage des Gleichgewichts zwischen der Alloxazin- und der Isoalloxazinform des Lumichroms ist unter anderem vom Lösungsmittel und dem pH-Wert abhängig [64, 65]. Auch ist das Gleichgewicht im angeregten Zustand im Vergleich zum Grundzustand in wässriger Lösung aufgrund der veränderten Ladungsverteilung verschoben [66].

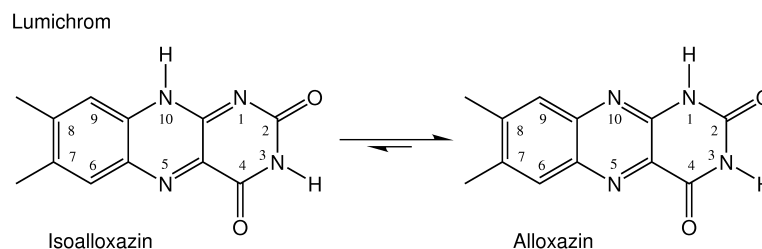


Abbildung 3.2: Lumichrom weist strukturelle Ähnlichkeiten mit den Flavinen auf. Allerdings liegt Lumichrom bevorzugt in der stabileren Alloxazinform vor. Eine Substitution an der N10-Position verhindert eine Tautomerisierung und führt zu stabilen Isoalloxazinsystemen.

Das UV/vis-Absorptionsspektrum von Flavinen in neutraler wässriger Lösung weist vier charakteristische Banden auf. In Abbildung 3.3 ist exemplarisch das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Riboflavin in wässriger Lösung gezeigt mit den Absorptionsmaxima bei 445 nm, 373 nm, 264 nm und 221 nm. Die Absorptionsbande mit der Zentralwellenlänge von 445 nm ist dem $S_0 \rightarrow S_1$ Übergang zuzuordnen, während bei 373 nm der $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang angeregt wird [67, 68]. Es handelt sich jeweils um $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge. Die beiden höherenergetischen Absorptionsbanden wurden in einer Reihe von theoretischen Ansätzen behandelt, die Natur der Übergänge konnte aber noch nicht restlos aufgeklärt werden [69–72]. Es handelt sich vermutlich ebenfalls um $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge, wobei die Absorptionsbande um 264 nm sich wahrscheinlich aus mindestens zwei Übergängen mit ähnlicher Energie zusammensetzt [70, 72]. Flavine fluoreszieren nach Photoanregung aus dem ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1). Das Fluoreszenzspektrum besitzt ein Maximum um 520 nm (Abbildung 3.3).

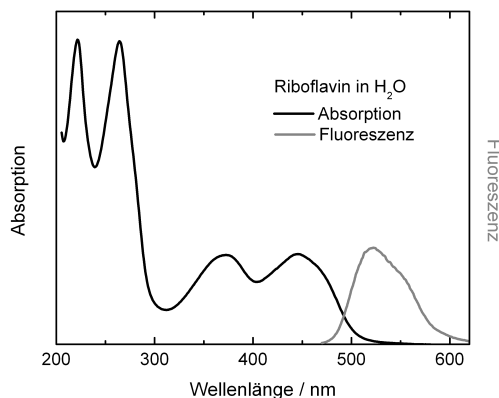


Abbildung 3.3: UV/vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Riboflavin in neutraler wässriger Lösung.

Flavine können in drei unterschiedlichen Oxidationszuständen vorliegen: Dem oxidierten, dem Semichinon- und dem reduzierten Zustand. Diese können wiederum in

unterschiedlich protonierten Zuständen existieren (Abbildung 3.4). Die große Bandbreite von Redox- und Protonierungszuständen ermöglicht Flavinen in einer großen Anzahl biologischer Reaktionen sowohl als Ein- als auch als Zweielektronen-Donor bzw. -Akzeptor zu fungieren, und macht sie so zu einem wichtigen Cofaktor in einer erheblichen Anzahl von Enzymen (siehe Kapitel 3.2).

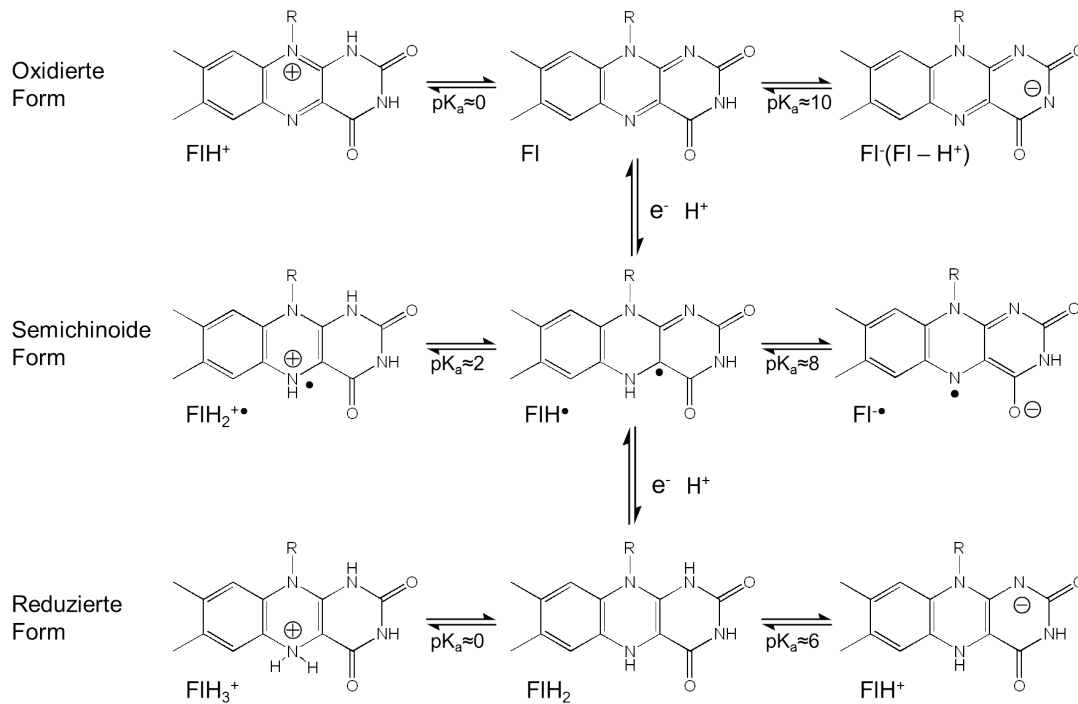


Abbildung 3.4: Strukturen der neutralen, anionischen und kationischen Flavine in ihren drei möglichen Redoxzuständen: Oxidiert, semichinoid und reduziert [73].

Flavine sind zudem photosensitiv und können unter Lichteinwirkung eine Reihe von Reaktionen eingehen. Dies macht sie zu idealen Photorezeptoren in vielen Flavoproteinen, zum anderen können aber auch durch Photoanregung Prozesse stattfinden, die zur Degradation der Flavinmoleküle führen. In Abbildung 3.5 sind exemplarisch die drei unterschiedlichen intramolekularen Hauptreaktionspfade gezeigt, die Riboflavin nach Photoanregung eingehen kann [74]. Neben den hier gezeigten intramolekularen Mechanismen können Photoaddition und Photoreduktion auch intermolekular stattfinden. Die meisten photoinduzierten Reaktionen der Flavine finden aus dem Triplett-Zustand statt, auch wenn der erste angeregte Singulett-Zustand aufgrund der höheren Energie der reaktiver sein sollte. Dies ist vor allem durch die sehr viel kürzere Lebensdauer des Singulett-Zustands zu erklären, die etwa 5 ns beträgt, während der Triplett-Zustand eine Lebensdauer von 10-50 μs aufweist. Aufgrund der kurzen Lebensdauer finden Reaktionen aus dem Singulett-Zustand hauptsächlich intramolekular oder mit hoch

konzentrierten Reaktanten wie z.B. dem Lösemittel statt. Lumichrom stellt hierbei das Hauptabbauprodukt von Riboflavin nach Photoanregung unter anaeroben Bedingungen dar [75].

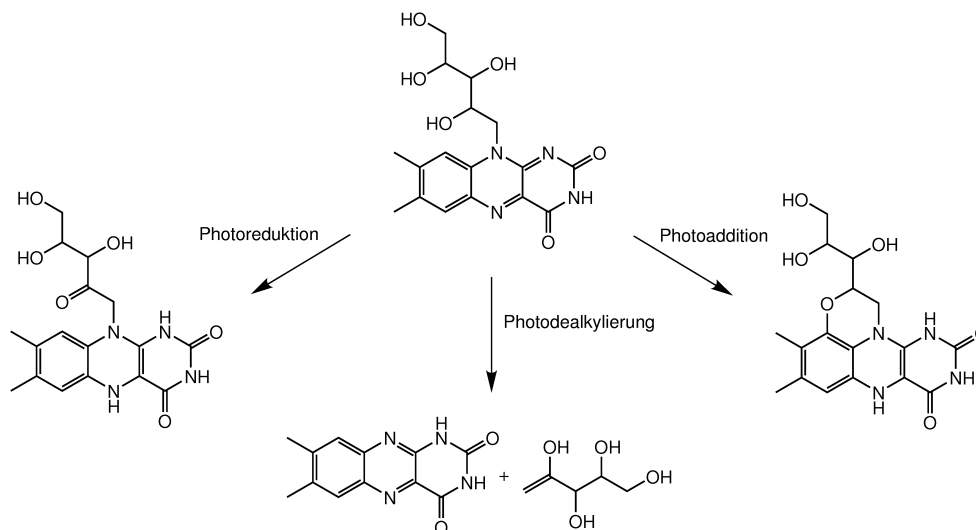


Abbildung 3.5: Die drei intramolekularen Haupt-Reaktionspfade des photoangeregten Riboflavins: Photoreduktion, Photodealkylierung und Photoaddition.

Die Fluoreszenz von Flavinen kann durch die Gegenwart von weiteren Flavinen oder anderen aromatischen Molekülen gelöscht werden. Grajek et al. untersuchten beispielsweise die Ausbildung von Flavindimeren bei hohen Flavinkonzentrationen und der damit verbundenen Fluoreszenzlöschung [76–80]. Dabei fungiert das Flavindimer als eine Art "Energiefalle". Die Anregungsenergie kann nicht wieder abgegeben werden und bleibt im Dimer gespeichert. Aus der Literatur sind weitere Beispiele der Fluoreszenzlöschung von Flavinen durch die Gegenwart von aromatischen Verbindungen bekannt. So konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz durch die Anwesenheit von Purinen gelöscht werden kann [68]. Dieser Effekt spielt beispielsweise bei FAD eine große Rolle, da hier die Flavin-einheit mit der Adenineinheit eines FAD-Moleküls wechselwirken kann. Unterschiedliche Arbeiten beschäftigen sich mit der Fluoreszenzlöschung des FADs und kommen zu dem Schluss, dass FAD in einer offenen und einer geschlossenen Konformation vorliegen kann, wobei die Flavin- und die Adenineinheit in gestapelter Form vorliegen und die π -Systeme miteinander wechselwirken. Durch einen Elektronentransfer von Adenin auf das photoangeregte Flavin wird dessen Fluoreszenz gelöscht [68, 81–86]. Elektronentransferprozesse, beispielsweise von aromatischen Aminosäuren auf photoangeregte Flavin-Cofaktoren, spielen auch bei vielen Flavoproteinen eine zentrale Rolle.

3.2 Flavoproteine

Während die meisten Flavoproteine FAD oder FMN als Cofaktor einsetzen, spielt Riboflavin eher eine Rolle als Grundbaustein in der Flavinbiosynthese. Hauptsächlich werden Flavine in Proteinen nicht kovalent gebunden, allerdings gibt es hier auch Ausnahmen [87], sondern durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Flavin und seiner Proteinumgebung. Durch entsprechende Auswahl und Anordnung der Aminosäurereste in der Flavinbindetasche können unterschiedliche Redox- und Protonierungszustände sowie auch verschiedene elektronische Zustände des Flavin-Cofaktors stabilisiert oder destabilisiert und somit die katalytischen Eigenschaften festgelegt werden. Dies eröffnet eine beeindruckende Bandbreite für katalytische Anwendungen von Flavin-Cofaktoren in verschiedenen Proteinen.

Enzyme, die Flavine als Cofaktoren beinhalten sind an einer Vielzahl biologischer Reaktionen beteiligt, darunter Elektronentransfer-, Redox-, Monooxygenierungs- und Dehydrogenierungsreaktionen. In der in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Thioredoxinreduktase fungiert beispielsweise ein FAD-Molekül als Überträger von Elektronen von NADPH auf ein redoxaktives Disulfid des Proteins und ist somit Teil der Reaktionskette, die schließlich zu der Reduktion des Thioredoxins führt [88, 89].

Des Weiteren kann Flavin in Proteinen als Chromophor fungieren, so Energie in Form von Licht aufnehmen und in Folgeaktionen weitergeben. Phototropine und Cryptochrome beispielsweise kontrollieren als Blaulichtrezeptoren eine Reihe verschiedener Funktionen wie Chloroplastenbewegung, Wachstumsrichtung, Blattwachstum und die Steuerung des zircadianen Rhythmus (24-Stunden-Rhythmus) [90–94]. LOV-Domänen (engl. **l**ight **o**xxygen **v**oltage) fungieren in Phototropinen als Blaulichtrezeptoren und nutzen FMN als Chromophor [90, 93]. Die Proteinumgebung stabilisiert nach Photoanregung den Triplettzustand des Flavins, der mit einem Cysteinrest in der Bindetasche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagiert.

Photolyasen nutzen blaues Licht zur Behebung eines der Hauptschäden, die durch UV-Licht an DNA verursacht werden können, dem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer [95]. Im Ausgangszustand liegt der Chromophor als neutrales Flavosemichinon im Protein vor und muss zunächst mit Hilfe von Licht aktiviert werden. Durch Photoanregung gelangt das Flavosemichinon in seinen angeregten Zustand. Über eine Kaskade von Tryptophanresten im Protein wird ein Elektron auf das Flavin übertragen und die Photolyase gelangt so in den aktivierten Zustand, anionisch und vollständig reduziert [94]. Durch erneute Photoanregung gelangt das aktivierte Flavin in den angeregten Zustand. Anschließend findet ein Elektronentransfer von dem aktivierten FADH⁻ zu dem Cyclobutanring statt. Der Adeninrest des FADs spielt hier eine wichtige Rolle als Mediator beim Elektronentransferprozess. Ist der Cyclobutanring gespalten, wird das Elektron schließlich auf das FADH-Molekül zurückübertragen.

Eine weitere wichtige Gruppe von Blaulichtrezeptoren sind die sogenannten BLUF-Domänen (engl. **b**lue **l**ight **s**ensing **u**sing **F**AD), die in einer Reihe von Proteinen entdeckt wurden [96]. Nach Photoanregung des in oxidiert Form vorliegenden FAD-Moleküls findet ein Elektronentransfer von einem benachbarten Tyrosinrest auf das angeregte Fla-

vin statt. Ein anschließender Protonentransfer vom kationischen Tyrosinradikal auf das Flavosemichinon führt zu dem Verlust von Wasserstoffbrücken zu einem Glutaminrest in der Flavinbindetasche, der daraufhin seine Konformation ändert [97–100]. Anschließend findet eine Rückübertragung des Protons und des Elektrons auf den Tyrosinrest statt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auch ein Elektronentransfer von einem Tryptophanrest auf das photoangeregte FAD stattfinden kann. Diese Reaktion führt jedoch lediglich zu einer Deaktivierung des angeregten Zustands und nicht zu der Ausbildung eines Signalzustands mit veränderter Konformation des Glutaminrestes [101].

Riboflavin spielt zwar als Cofaktor in Flavoproteinen nur eine untergeordnete Rolle, ist aber dringend notwendig für die Biosynthese von FMN und FAD. Riboflavinbindeteine (RfbP) haben daher die Aufgabe Riboflavin zu speichern, es vor unerwünschten Reaktionen zu bewahren und bei Bedarf frei zu setzen. Das in Kapitel 4 vorgestellte und untersuchte Dodecin aus *Halobacterium salinarum* ist ein solches RfbP. Auch aus anderen Organismen sind RfbP bekannt, sie besitzen jedoch deutlich andere Strukturen als das in dieser Arbeit untersuchte Dodecin-Protein [2–4, 6].

4 Dodecin

4.1 Einführung

Bei Dodecinen handelt es sich um Flavinbindeproteine. Wie ihr Name bereits andeutet, setzt sich ihre Quartärstruktur aus insgesamt zwölf Monomeren zusammen, die über elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Die dodecameren Proteine besitzen die Struktur einer Hohlkugel und verfügten jeweils über sechs identische Bindetaschen, wobei jede mit zwei Flavinen in antiparalleler Anordnung besetzt werden kann. Dabei bilden die Flavine mit zwei Tryptophanresten in der Bindetasche eine aromatische Tetrade aus. Mit nur 65-73 Aminosäuren pro Monomer und einer Flavinbeladung von zwölf Flavinen für das Dodecamer stellen sie die Flavinbindeproteine mit der höchsten bekannten Flavinbeladung dar. Dabei bilden die beiden Flavine mit zwei Tryptophanresten in der Bindetasche eine aromatische Tetrade aus. Erstmals konnte im Jahr 2003 die Kristallstruktur des archaealen Dodecins aus *Halobacterium salinarum* (HsDod) bestimmt werden (Abbildung 4.1) [6]. Mittlerweile konnte auch die Struktur bakterieller Dodecinproteine aus *Halorhodospira halophila* (HhDod) [102], *Thermus thermophilus* [103] und *Mycobacterium tuberculosis* [104] aufgeklärt werden. Während das archaeale Dodecin jedoch Riboflavin bindet, fungieren die bakteriellen Dodecine als FMN bindende Proteine.

4.1.1 Dodecin aus *Halobacterium salinarum*

Grininger et al. konnten zeigen, dass die Lebensdauer von Riboflavin unter Lichteinstrahlung um das etwa 200fache verlängert wird, wenn es eingebaut in HsDod anstelle von frei in Lösung vorliegt [5, 102]. Umfangreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass archaeales Dodecin unerwünschte Reaktionen von Riboflavin nach Photoanregung verhindert. Dadurch wird auch Riboflavin vor Photodegradation bewahrt und kann für eine Biosynthese von FMN und FAD bereit gestellt werden. HsDod kann somit die Konzentration dieser beiden Flavine während des Lebenszyklus von *Halobacterium salinarum* regulieren und nimmt eine Schlüsselfunktion in der Flavin-Homöostase ein. Ein Vergleich der zellulären Flavinkonzentration und der Expression von Dodecin deuten an, dass Dodecin bei wachstumslimitierenden Konzentrationen von Riboflavin, dieses an die Zelle abgeben kann. Somit wird die rasche Synthese der physiologisch relevanten Flavine FMN und FAD gewährleistet, wenn günstige Wachstumsbedingungen und damit verbundene hohe metabolische Aktivität dies erfordern [102]. Außerdem konnte für HsDod gezeigt werden, dass auch das zelltoxische Lumichrom, das Hauptabbauprodukt von Riboflavin, einen Cofaktor von HsDod *in vivo* darstellt. Die Notwendigkeit

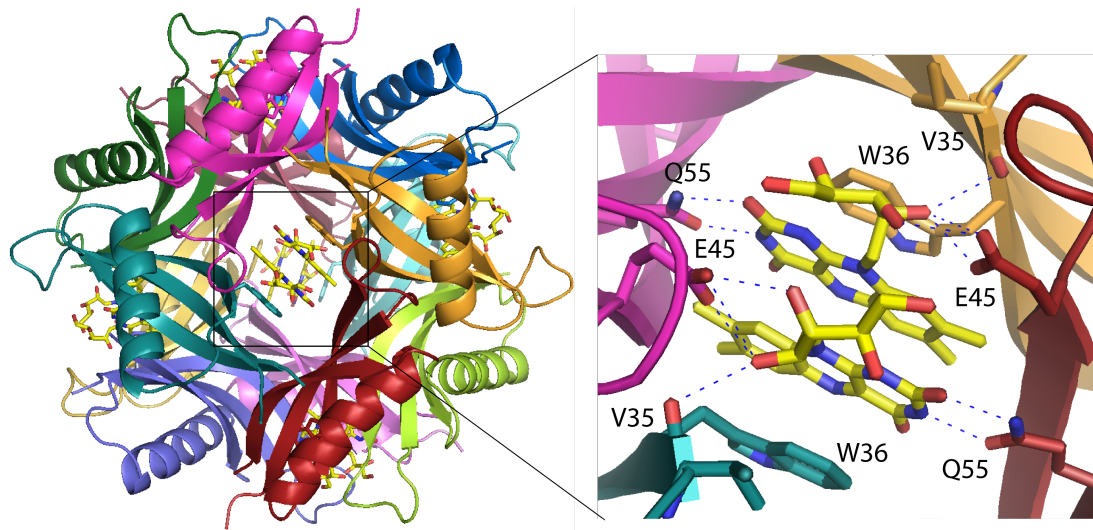


Abbildung 4.1: Kristallstruktur von Dodecin aus *Halobacterium salinarum*. Links ist das funktionsfähige Dodecamer gezeigt. Alle Bindetaschen sind mit jeweils zwei Riboflavinmolekülen besetzt (gelb), die einzelnen Monomere sind jeweils farblich gekennzeichnet. Rechts ist die Bindetasche besetzt mit zwei Riboflavinmolekülen mit den für die Bindung relevanten Aminosäuren gezeigt. Die Abbildung, sowie die folgenden strukturellen Darstellungen von Proteinen in dieser Arbeit, wurde mit dem Programm Pymole erstellt und die atomaren Koordinaten wurden PDB (engl. **protein databank**) entnommen (www.wwpdb.org, PDB ID: 1MOG, [6]).

eines effizienten Schutzes von lebensnotwendigem Riboflavin in Kombination mit dem Binden des zelltoxischen Hauptabbauproduktes nach Photoanregung hängt mit den Lebensbedingungen von *Halobacterium salinarum* zusammen. Das halophile Archaeon findet optimale Wachstumsbedingungen bei Salzkonzentrationen von etwa 4 M NaCl. Solch hohe Salzkonzentrationen werden beispielsweise in Meersalzgewinnungsanlagen oder Salzseen erreicht, aber auch in eingesalzener Nahrung. In den flachen Salzseen sind die Organismen hoher UV-Strahlung ausgesetzt, die sie zur Entwicklung einiger Schutzmechanismen gezwungen hat. So schützt die Einlagerung von Carotinoiden in die Cytoplasmamembran die Zelle, diese sind auch mitverantwortlich für die rötliche Farbe solcher Salzseen [105]. Diese Lebensbedingungen erfordern auch einen Schutz des lebensnotwendigen Riboflavins vor Photodegradation und ein Unschädlichmachen von entstandenem Lumichrom. Diese Aufgaben werden von HsDod erfüllt.

Struktur des archaealen Dodecins

HsDod setzt sich aus zwölf Monomeren mit jeweils 68 Aminosäuren zusammen (Abbildung 4.1). Jedes Monomer besitzt lediglich einen Tryptophanrest (W36), der an der Ausbildung der aromatischen Tetrade mit zwei Flavinresten in der Bindetasche beteiligt ist. Der Abstand zwischen den beiden Isoalloxazineinheiten beträgt etwa 3,2 Å, während der Abstand zwischen einem Tryptophanrest und dem nächsten Isoalloxazin etwa 3,4 Å misst.

Die beiden Flavine sind mit ihren *re*-Seiten zueinander angeordnet und die *si*-Seite ist jeweils zum Tryptophanrest hin ausgerichtet. Die Definitionen der *re*- und *si*-Seiten wurden von Pai et al. übernommen [106]. Weiterhin wirken die Aminosäurereste von E45 und Q55 stabilisierend, indem sie Wasserstoffbrücken zu dem Ribitylrest von Riboflavin, bzw. dem Isoalloxazinsystem ausbilden. Auch zwischen dem Sauerstoff der Carbonylgruppe von V35 und der Ribitylkette wird eine stabilisierende Wasserstoffbrücke ausgebildet. Außerdem ist das Flavin in der Bindetasche durch Wasserstoffbrücken mit einem Wassermolekül verknüpft, das an ein Magnesiumion koordiniert ist, welches sich unterhalb der Bindetasche befindet. Durch die Aminosäure D41 werden diese Magnesiumionen an der entsprechenden Position fixiert (Abbildung 4.2).

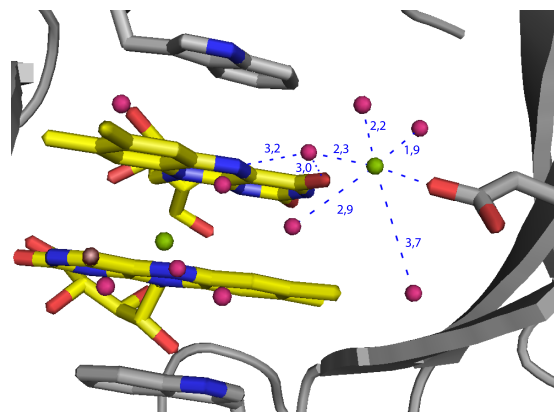


Abbildung 4.2: Mit Wasser (rot) koordiniertes Magnesiumion (grün) unterhalb der Bindetasche von HsDod. Das Magnesiumion ist außerdem mit der Carboxylgruppe von D41 koordiniert. Die Abstände sind nur für eines der beiden symmetrieverwandten Magnesiumionen angegeben, gelten natürlich aber genauso für das andere. Die atomaren Koordinaten für das Protein wurden PDB entnommen (PDB ID: 1MOG, [6]).

Effiziente Fluoreszenzlöschung des gebundenen Riboflavins

π -Stacking-Systeme treten bei vielen Flavoproteinen auf [107, 108], allerdings ist das Binden von Riboflavindimeren bisher nur von Dodecin-Proteinen bekannt [6, 102–104]. Während Riboflavin in wässriger Lösung eine deutliche Fluoreszenz um 520 nm aufweist, zeigt HsDod-gebundenes Riboflavin keinerlei Fluoreszenz. Dieses Verhalten ist auch von anderen RfbP, sowie von Flavindimeren bekannt [76, 77]. Bei dem RfbP aus Hühnereiweiß führt ein ultraschneller Elektronenübertrag von einem Tryptophanrest auf das photoangeregte Flavin mit anschließendem Rücktransfer zu einer effizienten Löschung der Fluoreszenz [4, 109]. Ähnlich wie bei Dodecin findet man auch bei diesem RfbP das Flavinmolekül in einer π -gestackten Struktur mit aromatischen Aminosäureresten, in diesem Fall ist das Flavin zwischen einem Tryptophan- und einem Tyrosin-Rest angeordnet. Schnelle Elektronentransferreaktionen von aromatischen Aminosäureresten auf photoangeregte Flavine findet man nicht nur in Flavinbindeproteinen, sondern auch

beispielsweise in BLUF-Domänen [98, 101], Cryptochromen [94] und DNA-Photolyasen [95]. In diesen Fällen dient der Mechanismus jedoch nicht dem Schutz der Flavine vor Photodegradation, sondern der Weiterleitung eines lichtinduzierten Signals. Die Löschung der Fluoreszenz bei Flavindimeren basiert auf einem nichtstrahlenden Energietransfer zwischen den Flavinen, der Dimere zu idealen Energiefängern macht [76–80]. Analoges Verhalten wird auch für eine Reihe anderer Farbstoffdimere, z. B. Rhodamin, beobachtet [110].

Dodecin mit verschiedenen Cofaktoren

Neben Riboflavin kann HsDod auch andere Cofaktoren binden. Wie bereits erwähnt ist auch Lumichrom, das eine Alloxazinstruktur besitzt, ein auch in der Natur vorkommender Cofaktor. Lumiflavin hingegen ist kein natürlicher Cofaktor, wird aber *in vitro* mit hoher Affinität gebunden. Insgesamt konnte gezeigt werden dass der Einbau kleiner Cofaktoren, also Lumiflavin und Lumichrom, dadurch bevorzugt ist, dass aufgrund des Fehlens der Ribitylkette eine stabilere Position, etwas verkippt zu der Riboflavin-Bindeposition, eingenommen werden kann [5, 111]. In dieser Position können die π -Systeme der Isoalloxazine, bzw. Alloxazine noch besser mit denen der Tryptophanreste wechselwirken. Bei Riboflavin kompensiert die Ribitylkette durch die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken die weniger günstige Position der Isoalloxazineinheit. Dadurch wird hohe Affinität sowohl für die Bindung von Riboflavin als auch von Lumichrom gewährleistet. In Abbildung 4.3 ist die unterschiedliche Bindeposition der Cofaktoren Riboflavin und Lumiflavin, die der des Lumichrom sehr ähnlich ist, schematisch dargestellt. Die unterschiedlichen Positionen in der Bindetasche werden hier als offene und geschlossene Position bezeichnet. Für Riboflavin kann eine quasi-geschlossene Position erreicht werden, indem der Aminosäurerest E45 mit Hilfe von Mutation durch Alanin ausgetauscht wird. Dabei geht allerdings auch die stabilisierende Wechselwirkung zwischen E45 und der Ribitylkette verloren.

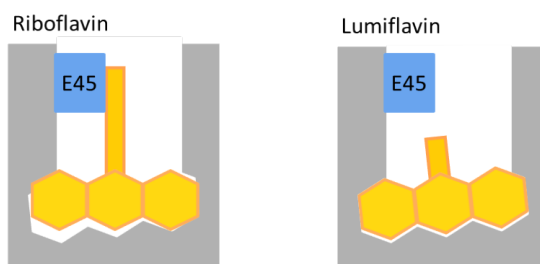


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des unterschiedlichen Einbaus von Riboflavin und Lumiflavin in der HsDod-Bindetasche. Die Position des Lumiflavins ist gegenüber der des Riboflavins um etwa 4° verkippt [5, 111]. Lumichrom bindet in einer Position, die der des Lumiflavins sehr ähnlich ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass HsDod in der Lage ist FAD aus wässriger Lösung zu binden [5, 112]. Dabei wird FAD in seiner geschlossenen Konformation

gebunden, was bedeutet, dass die zweite Flavinposition in der Bindetasche von dem Adeninrest des FADs besetzt wird (Abbildung 4.4). FAD stellt jedoch keinen Cofaktor von HsDod *in vivo* dar, der Einbau in HsDod besitzt vermutlich keine physiologische Funktion. Er kann im Folgenden aber ausgenutzt werden, um zu überprüfen, ob der Einbau von zwei Flavinen in einer Bindetasche von Bedeutung für den Löschungsmechanismus ist, oder ob der Einbau von Dimeren lediglich der Maximierung der Flavinbeladung dient.

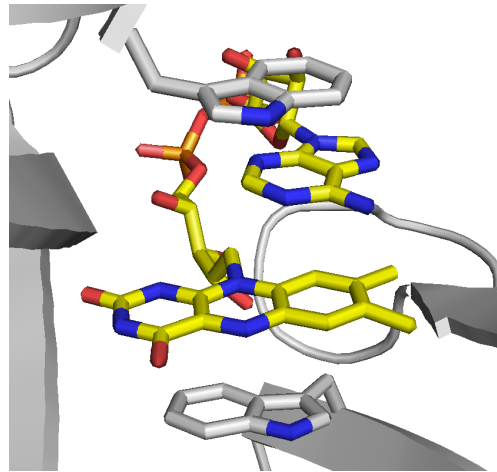


Abbildung 4.4: Bindetasche von HsDod besetzt mit einem FAD-Molekül in seiner geschlossenen Konformation. Gezeigt ist die Bindetaschenanordnung von HsDod wenn es mit Riboflavin besetzt ist, in die FAD eingepasst wurde. Diese Abbildung dient der Verdeutlichung, wie FAD eingebaut wird. Die Kristallstruktur von mit FAD besetztem HsDod weist jedoch kaum Unterschiede zu mit Riboflavin besetztem HsDod auf, weshalb es legitim ist diese Darstellung zum besseren Verständnis einzusetzen. Die atomaren Koordinaten wurden PDB entnommen (PDB ID: 1MOG, [6]).

4.1.2 Dodecine aus anderen Organismen

Neben dem archaealen HsDod existieren eine Reihe homologer Proteine [111], so z. B. die bakteriellen Dodecine aus *Halorhodospira halophila* (HhDod), *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* oder *Thermus thermophilus*, die ebenfalls eine dodecamere Quartärstruktur aufweisen, deren Bindetaschen sich aber von denen des archaealen Dodecins unterscheiden [102–104, 113]. Der augenscheinlichste Unterschied ist die Anordnung der Isoalloxazineinheiten. Während sie im HsDod *re-re* angeordnet sind, sind sie in bakteriellen Dodecinen *si-si* orientiert. Des Weiteren dient den bakteriellen Dodecinproteinen nicht Riboflavin sondern FMN als natürlicher Cofaktor, was durch die Anordnung der Aminosäuren in der Bindetasche bedingt ist. Die physiologische Funktion der bakteriellen Dodecine ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen an Dodecin aus *Thermus thermophilus* deuten auf eine Funktion als bifunktionales Bindeprotein für Coenzym A und FMN hin [103]. Ergebnisse für NADH:FMN Oxidoreductase (EmoB), das sowohl NADH und FMN als auch Dimere von FMN binden kann, geben

Hinweise, dass bakterielle Dodecine FMNH₂ für Redoxreaktionen in Partnerproteinen zur Verfügung stellen könnten [114].

Dodecin aus *Halorhodospira halophila*

In Abbildung 4.5 sind die Bindetaschen von HsDod und HhDod, beide besetzt mit Riboflavin, gegenübergestellt [6, 102]. Auffällig ist der Unterschied in der Anordnung der Flavine in der Bindetasche. Im archaealen Dodecin sind sie mit ihren *re*-Seiten zueinander orientiert, während sie in HhDod mit den *si*-Seiten zueinander ausgerichtet sind. Außerdem fällt auf, dass die Tryptophanreste im HhDod etwas verkippt sind, so dass die Anordnung der aromatischen Tetrade weniger akkurat ist. Der Abstand zwischen den beiden Isoalloxazineinheiten beträgt 3,7 Å, und ist somit etwas größer als im Falle des HsDods. Der Abstand zwischen einem Tryptophan und dem nächsten Isoalloxazin ist mit etwa 3,4 Å für beide Dodecine gleich groß. Im HhDod sind zudem andere Aminosäuren an der Bindung des Flavins in der Bindetasche beteiligt als im Falle des HsDod. Ein Asparagin-, ein Tyrosin- und ein Histidinrest sind jeweils durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken an der Bindung eines Flavins in der Bindetasche beteiligt.

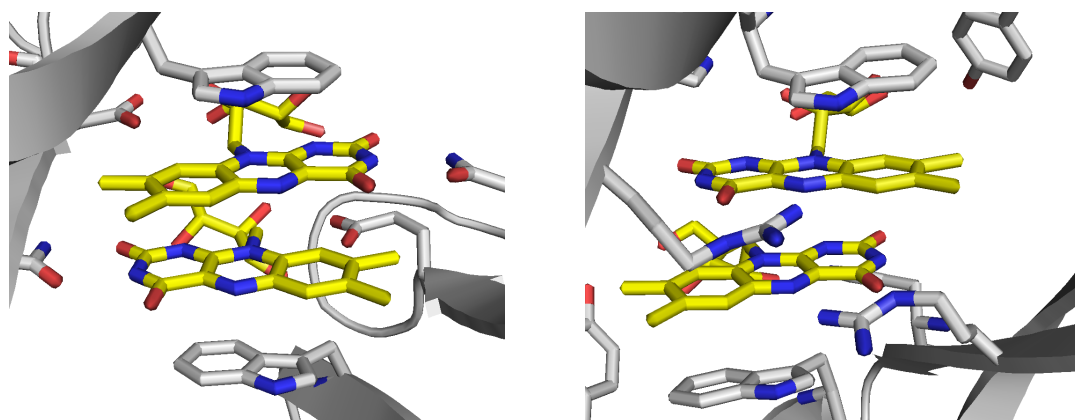


Abbildung 4.5: Flavin-Bindetasche von HsDod (links) und HhDod (rechts) jeweils besetzt mit Riboflavin zu Verdeutlichung des unterschiedlichen Flavineinbaus in archaealem und bakteriellem Dodecin [6, 102]. Die atomaren Koordinaten wurden PDB entnommen (HsDod: PDB ID: 1MOG [6], HhDod: PDB ID: 2VXA [102]).

4.2 Motivation: Aufklärung des Reaktionsmechanismus

Bereits aus anderen Proteinen, die Flavine als Cofaktoren nutzen, sind Mechanismen bekannt, die zu einer Löschung der Fluoreszenz der Flavinliganden führen. Je nach Funktion des Proteins wird der Flavinligand in unterschiedlicher Weise in andere Zustände

überführt, dort stabilisiert oder wieder in den Ausgangszustand zurück versetzt. Die Anordnung von Aminosäuren und Flavinliganden in der HsDod-Bindetasche, sowie die Eigenschaft des Proteins die Lebensdauer von Riboflavin unter Lichteinwirkung um das 200fache zu erhöhen, legen am ehesten einen Vergleich mit dem umfassend erforschten Riboflavinbindepotein aus Hühnereiweiß nahe. Von diesem RfbP ist bekannt, dass ein ultraschneller Elektronentransfer von einem Tryptophanrest in der Bindetasche zu dem photoangeregten Flavin gefolgt von einem Elektronenrücktransfer zu einer schnellen Entvölkerung des angeregten Zustands des Flavins führt und somit die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Reaktionen herabgesetzt wird [3, 109, 115, 116]. In ähnlicher Weise könnten auch die beiden Tryptophanreste in der Bindetasche des HsDods als Elektronendonoren fungieren.

Eine Besonderheit der HsDod-Bindetasche ist die Eigenschaft, zwei Riboflavinmoleküle in einer Bindetasche einlagern zu können. Dies wirft die Frage auf, ob das zweite Flavin relevant für den Mechanismus, der zu der Fluoreszenzlöschung des Flavins führt, ist, oder ob hier lediglich eine Optimierung der Flavinbeladung des Proteins vorliegt. Es ergeben sich aus der Gestaltung der HsDod-Bindetasche weitere Fragestellungen. So ist zu klären, welche Rolle der aromatischen Tetrade und dem π -Stacking zugeordnet werden kann. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Ribitylkette einen Beitrag zu dem Fluoreszenzlöschungsmechanismus liefert. Eventuell spielen hier auch Wasserstoffbrücken zu Aminosäureresten in der Bindetasche oder zu Lösungsmittelmolekülen eine Rolle. Zudem könnte die gleichzeitige Bindung von Lumichrom und Riboflavin Auswirkungen auf den Löschungsmechanismus besitzen.

Die Eigenschaft des archaealen Dodecins unterschiedliche Cofaktoren in seiner Bindetasche einzubauen, eröffnet die Möglichkeit, die Relevanz einiger Faktoren in der Bindetasche zu untersuchen. Mit Hilfe von Lumiflavin besetztem HsDod kann der Einfluss der Ribitylkette sowie der leicht veränderten Position in der Bindetasche untersucht werden. Die mit FAD besetzte HsDod-Bindetasche eröffnet die Möglichkeit die Rolle des zweiten Flavins näher zu betrachten. Auch mit HsDod, das Riboflavin und Lumichrom gemeinsam gebunden trägt, kann der Einfluss des zweiten Flavins untersucht werden. Zudem ermöglicht diese Bindetaschenanordnung die Untersuchung des Einflusses von Lumichrom, das auch einen Cofaktor von HsDod *in vivo* darstellt, auf den Löschungsmechanismus des photoangeregten Flavins. HsDod in deuteriertem Lösungsmittel erlaubt die Untersuchung eines Einflusses des Lösungsmittels, während mutierte HsDod-Proteine ohne wasserkoordiniertes Magnesiumion unterhalb der Bindetasche die Untersuchung dessen Einflusses erlauben. Die Rolle der Tryptophane kann nicht durch einfache Mutation dieser Aminosäurepositionen festgestellt werden, da die Flavinbindung dann nicht mehr effizient erfolgen kann. Einbau von Tryptophanderivaten eröffnet hier jedoch neue Möglichkeiten. So können beispielsweise die Elektronendoneigenschaften des Tryptophans verändert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, den Elektronentransfer vom Tryptophan auf das photoangeregte Flavin zu untersuchen und zeigt zudem das Potential, das der Einsatz von nicht natürlichen Aminosäuren zur Manipulation von Proteinfunktionen bietet.

Schnelle photophysikalische Prozesse können mit Hilfe der Anreg-Abtast-Spektroskopie

untersucht werden. Die zeitaufgelöste Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich ist ein effektives Mittel zur Untersuchung des Mechanismus, der zur Löschung der Flavinfluoreszenz und der Verlängerung der Lebensdauer von Riboflavin beiträgt.

Des Weiteren ist ein Vergleich der Lösungsmechanismen des archaealen und des bakteriellen Dodecins von hohem Interesse. Das Binden von FMN anstelle von Riboflavin und die abweichende Gestalt der Bindetasche lassen vermuten, dass die Funktion der bakteriellen Dodecine eine andere ist. Diese sollte sich in unterschiedlichen Ergebnissen der transienten Messungen für archaeales und bakterielles Dodecin niederschlagen.

4.3 Experimentelle Vorgehensweise

Die Proben des archaealen und bakteriellen Dodecins wurden von M. Grininger und D. Oesterhelt, Max Planck Institut für Biochemie (Martinsried), zur Verfügung gestellt. Detaillierte Beschreibungen zur Proteinexprimierung und -reinigung finden sich in [5, 111]. HsDod mit unterschiedlichen Cofaktoren (Riboflavin, Lumiflavin, FAD und Lumichrom) sowie die HsDod-Mutanten D41E und D41S wurden zunächst als Apoproteine synthetisiert und anschließend mit den entsprechenden Cofaktoren versetzt. Durch Dialyse wurden überschüssige Cofaktoren entfernt. Alle HsDod-Proben wurden in 20 mM TRIS-Puffer mit 1 M NaCl und 5 mM MgCl₂ untersucht. Der pH-Wert der Proben in H₂O betrug dabei 7,5. Für die Proben in deuteriertem Lösungsmittel wurden die HsDod-Proben sukzessive mit einem entsprechenden D₂O-Puffer dialysiert. Der pD-Wert war hierbei 7,9. Bei den Proben wurde zunächst mit Hilfe von Spritzenvorsatzfiltern (Whatman, Porengröße 0,2 μm) ausgefallenes Protein abgetrennt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von Zentrifugalfiltern (Amicon Ultra Millipore, 30000 MWCO) aufkonzentriert. Die Absorption der Proben lag bei etwa 0,2-0,5 bei einer Wellenlänge von 445 nm und einer Schichtdicke von 1 mm.

Riboflavin, Lumiflavin, FAD und Lumichrom wurden als Referenz ebenfalls in 20 mM TRIS-Puffer mit 1 M NaCl und 5 mM MgCl₂ mit einem pH-Wert von 7,5 untersucht. Riboflavin und Lumiflavin wurden jeweils in gesättigter Lösung untersucht, wobei die Absorption bei 445 nm etwa 0,3 betrug (Schichtdicke 1 mm). In diesem Konzentrationsbereich war keine Unterdrückung der Fluoreszenz aufgrund von Dimerbildung zu beobachten (siehe hierzu Kapitel 3.1). Die Konzentration von FAD wurde so eingestellt, dass sie ebenfalls etwa 0,3 betrug. Lumichrom wurde in gesättigter Lösung untersucht. Aufgrund der schlechten Löslichkeit konnte hier nur eine Absorption von etwa 0,1 bei 350 nm (Schichtdicke 1 mm) erreicht werden. Die Absorptionsspektren der Proben sind in Kapitel 4.4 in den jeweiligen Unterkapiteln gezeigt.

Die Tryptophanderivate wurden in der Arbeitsgruppe von N. Budisa, Technische Universität Berlin, aus den Indolderivaten und L-Serin mit Hilfe von Tryptophansynthase synthetisiert [117]. Der Einbau in HsDod wurde mittels der SPI-Methode (**s**elective **p**ressure **i**ncorporation) erreicht [118]. Vorteilhaft ist hierbei, dass HsDod lediglich ein Tryptophan pro Monomer (W36) enthält. Dabei handelt es sich um den Tryptophanrest,

der Teil der aromatischen Tetrade in der Bindetasche ist. Anschließend wurde mit den HsDod-Analoga-Proben ebenso wie mit den anderen HsDod-Proben verfahren.

Die HhDod-Proben wurden analog zu den HsDod-Proben vorbereitet, allerdings wurde ein 20 mM TRIS-Puffer mit 300 mM NaCl verwendet, der pH-Wert lag bei 8. Vor dem Aufkonzentrieren wurde etwa 120 mM Ectoin zur Stabilisierung zugegeben. Die Proben wurden ebenfalls auf eine Absorption von 0,2-0,5 bei 445 nm (Schichtdicke 1 mm) eingestellt.

Für die statischen Spektren wurde ein UV/vis-Spektrometer des Typs Specord S100 der Firma Analytik Jena verwendet. Die transienten Messungen im UV/vis-Spektralbereich wurden mit Hilfe des in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Aufbaus durchgeführt. Dabei wurden stets Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Durch eine Translationsbewegung der Küvette in zwei Richtungen wurde der Austausch des Probevolumens zwischen zwei Abtastpulsen gewährleistet. Es wurden unterschiedliche Anregungswellenlängen verwendet (siehe hierzu Kapitel 2.3.1): Anregungspulse bei 388 nm wurden mittels Frequenzverdopplung erzeugt. Pulse mit Zentralwellenlängen um 475 nm wurden mit Hilfe eines NOPA-Aufbaus generiert. Anregungspulse mit Zentralwellenlängen um 345 nm und 440 nm wurden jeweils mittels Summenfrequenzmischung aus einem NOPA-Puls und der Laserfundamentalen in einem BBO-Kristall mit einem Schnittwinkel θ von 36° bzw. 26° erzeugt. Die Energie der Anregungspulse lag zwischen 30 nJ und 100 nJ. Breitbandige Abtastpulse wurden in einem Saphir- oder in einem CaF_2 -Substrat aus der Laserfundamentalen generiert. Der Messbereich erstreckte sich dabei jeweils von etwa 440 nm bis 750 nm bzw. von etwa 360 nm bis 670 nm. Die Kreuzkorrelationsbreite der Experimente lag je nach Einstellungen zwischen 150 fs und 250 fs. Bei den Messungen mit Anregungspulsen aus der Frequenzverdopplung und Summenfrequenzmischung waren die Polarisierungen von Anregungs- und Abtastpuls jeweils senkrecht zueinander, während die Anregungspulse aus dem NOPA parallel zum Abtastpuls polarisiert waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Polarisationsabhängigkeiten der Signale ausgewertet.

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Dodecin aus *Halobacterium salinarum* mit Riboflavin

Die Funktion von Dodecin aus *Halobacterium salinarum* besteht darin, Riboflavin vor Photodegradation zu schützen. Um den Mechanismus, der eine Reaktion des photoangeregten Flavins verhindert und vermutlich eine schnelle Entvölkerung des angeregten Zustands beinhaltet, aufklären zu können, werden zunächst statische und transiente spektroskopische Untersuchungen an HsDod durchgeführt, dessen Bindetaschen ausschließlich mit Riboflavin besetzt sind.

Statische Absorptionsspektroskopie

Um die spektralen Eigenschaften des Riboflavins eingebaut in HsDod und frei in wässriger Lösung miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst statische UV/vis-

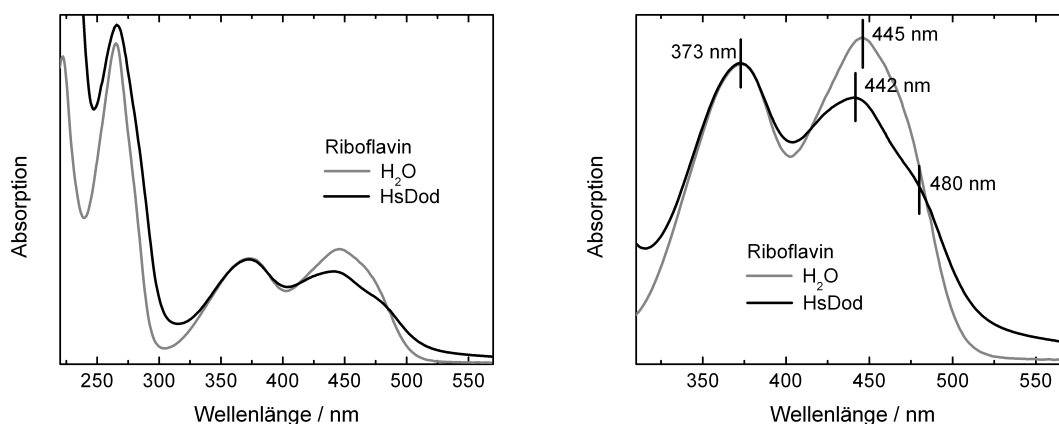


Abbildung 4.6: Statisches Absorptionsspektrum von Riboflavin in wässriger Pufferlösung (grau) sowie gebunden in HsDod (schwarz). Links ist der Spektralbereich zwischen 220 nm und 570 nm gezeigt. Die Abbildung rechts zeigt den Bereich zwischen 310 nm und 570 nm, der lediglich von der Absorption des Chromophors Riboflavin bestimmt ist. Die Wellenlängen der Maxima, sowie der Schulter, die im Falle des HsDod-gebundenen Riboflavins zu beobachten ist, sind angegeben. Die Spektren wurden auf die Absorption bei 373 nm normiert.

Absorptionsspektren aufgenommen (Abbildung 4.6). Im Spektralbereich zwischen 220 nm und 250 nm zeigen sich erhebliche Unterschiede zwischen Riboflavin in Pufferlösung und HsDod-gebundenem Riboflavin. In diesem Spektralbereich wird die Absorption des Chromophors von der Absorption aromatischer Aminosäurereste überlagert [119]. Da die Absorption der Phenylalaninreste eher gering ist, tragen hauptsächlich die Reste Tryptophan (W36) und Tyrosin (Y54) zu der Absorption in diesem Spektralbereich bei, wobei der Extinktionskoeffizient von Tryptophan in diesem Spektralbereich etwa viermal höher ist als der des Tyrosins. Tryptophan besitzt zudem ein Absorptionsmaximum um 280 nm und Tyrosin bei 260 nm. Hier dominiert jedoch die Absorption des Chromophors Riboflavin das Spektrum. Oberhalb von 300 nm tritt keine Absorption durch Aminosäurereste mehr auf und das statische UV/vis-Absorptionsspektrum wird lediglich von der Absorption des Chromophors Riboflavin bestimmt. Das Spektrum in Abbildung 4.6 rechts zeigt die Absorption im Bereich des $S_0 \rightarrow S_1$ - und des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs. Lediglich eine leichte Verschiebung der $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande bei 445 nm um 3 nm hin zu kürzeren Wellenlängen und die Ausbildung einer Schulter um 480 nm resultiert aus dem Einbau von Riboflavin in das Dodecin-Protein. Die Position der $S_0 \rightarrow S_2$ -Bande bei 373 nm erfährt keine Verschiebung. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Absorptionsspektren von Flavinen in anderen Flavoproteinen [120, 121]. Ein Einbau des Cofaktors in das jeweilige Protein verursacht hier eine ähnliche Verschiebung der Absorptionsbanden. Die Verschiebung der Banden resultiert vermutlich aus der Ausbildung von Wasserstoffbrücken in der Bindetasche, während die Schulter um 480 nm auf Wasserstoffbrücken sowie auf Wechselwirkungen zwischen den π -Systemen der Isoalloxazinsysteme und

Tryptophane zurückzuführen ist. Auch bei Flavindimeren wurden ähnliche Effekte in den Absorptionsspektren beobachtet [78, 80]. Die geringen Veränderungen des Absorptionsspektrums des Riboflavins beim Einbau in HsDod sind insofern bemerkenswert, da die Absorptionsbanden von Flavinen im Allgemeinen eine deutliche Abhängigkeit von ihrer Umgebung zeigen, wenn sie z. B. in unterschiedlichen Lösungsmitteln betrachtet werden [122]. Des Weiteren ist eine Änderung in den Verhältnissen der Absorptionsbanden der beiden Übergänge zueinander zu beobachten. Im Verhältnis zur Absorption des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs nimmt die Absorption des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs beim Einbau des Riboflavins in HsDod ab.

Transiente Absorptionsspektroskopie

Beim Einbau von Riboflavin in HsDod wird die Fluoreszenz des Chromophors gelöscht. Um diesen Lösungsmechanismus näher zu untersuchen, wurden transiente UV/vis-Absorptionsspektren von Riboflavin in Lösung sowie eingebaut in HsDod aufgenommen und miteinander verglichen. In Abbildung 4.7 unten ist eine Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen von freiem Riboflavin in Pufferlösung und eingebaut in HsDod nach Photoanregung bei 388 nm und Saphir-Weißlicht zur Abtastung gezeigt. Die Anregung liegt im Bereich der langwelligen Flanke der $S_0 \rightarrow S_2$ -Bande. Die Rolle der Anregungswellenlänge wird in einem späteren Abschnitt behandelt (siehe Kapitel 4.4.1). Hier wird sich zeigen, dass die Dynamik der transienten Absorptionsänderungen unabhängig von der Anregungswellenlänge ist, weshalb die Ergebnisse mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen hier verglichen werden dürfen. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Absorptionsänderungen nach einer Photoanregung des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs das transiente Verhalten des S_1 -Zustands zeigen, da der $S_2 \rightarrow S_1$ -Übergang schneller als die Zeitauflösung des Experiments ist. Abbildung 4.7 oben zeigt die Ergebnisse einer Messung mit CaF_2 -Abtastweißlicht und einer Anregung bei 475 nm.

Riboflavin in wässriger Pufferlösung zeigt nach Photoanregung bei 475 nm eine positive Absorptionsänderung unterhalb von 400 nm, die einer Absorption des ersten angeregten Zustands S_1 entspricht. Um 500 nm erkennt man eine weitere positive Absorptionsänderung, die dem $S_1 \rightarrow S_4$ -Übergang zuzuordnen ist, sowie eine positive Absorptionsänderung oberhalb von etwa 630 nm, die dem $S_1 \rightarrow S_3$ -Übergang zugeordnet werden kann [123]. Die negative Absorptionsänderung um 450 nm entspricht dem Ausbleichen des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs, während das negative Signal um 560 nm von einer stimulierten Emission des photoangeregten Riboflavins herrührt. Die Signale zeigen alle eine Lebensdauer, die länger als die maximale Verzögerungszeit des Experiments (1,5 ns) ist. Dies steht in Einklang mit der Fluoreszenzlebensdauer von Riboflavin in Lösung von etwa 5 ns [74].

Vergleicht man die Ergebnisse für Riboflavin in Lösung nun mit den Ergebnissen für Riboflavin, das in HsDod eingebaut ist, so fällt vor allem auf, dass die Lebensdauern der Differenzsignale deutlich kürzer sind. Bereits nach etwa 10 ps sind alle Differenzsignale zerfallen und der Ausgangs-Grundzustand ist wieder erreicht. Einige kleinere Signale am Ende der Verzögerungszeit sind vermutlich auf freie Riboflavinmoleküle in Lösung

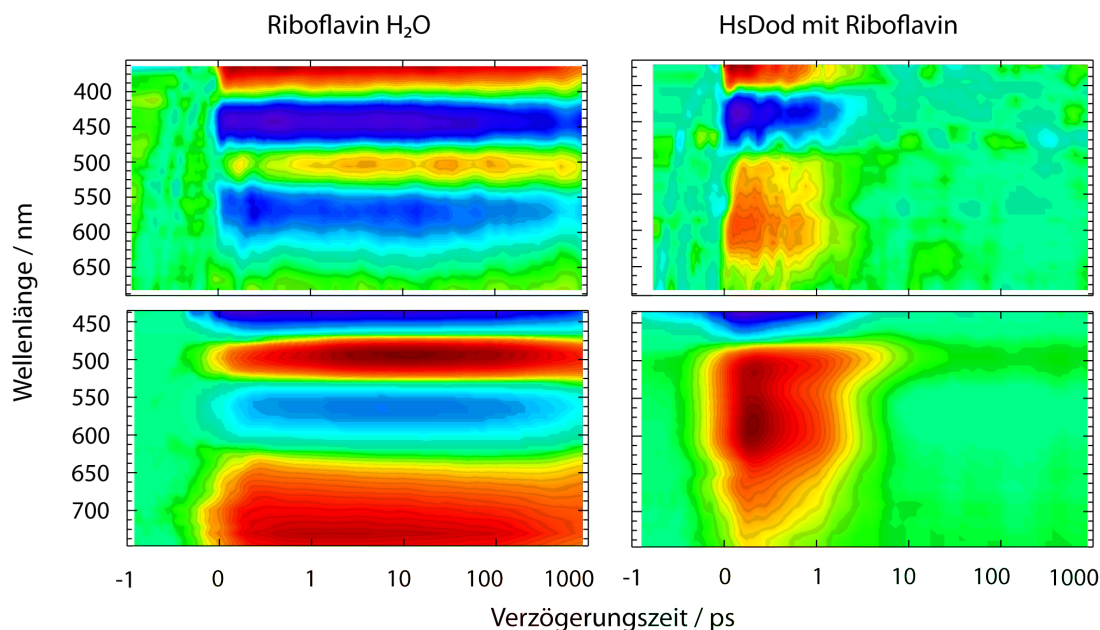


Abbildung 4.7: Überblick über die transienten Absorptionsänderungen von Riboflavin in Pufferlösung bei pH 7,5 und eingebaut in HsDod. Die Absorptionsänderungen sind farbcodiert: rot steht für positive, blau für negative und grün für keine Absorptionsänderungen. Die Verzögerungszeit-Skala ist linear für Verzögerungszeiten ≤ 1 ps und logarithmisch für größere Verzögerungszeiten. Die Farbcodierung sowie die linear/logarithmische Skaleneinteilung wird für alle folgenden Übersichtsdarstellungen der transienten Absorptionsänderungen verwendet. Oben sind die Ergebnisse nach einer Photoanregung bei 475 nm und CaF_2 -Weißlicht zur Abtastung, unten die Ergebnisse einer Anregung bei 388 nm und Saphir-Weißlicht gezeigt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist bei den letzteren Spektren deutlich besser, da zum einen in einem Bereich angeregt wird, in dem die Probe eine höhere Absorption besitzt, zum anderen sowohl das Anregungs- als auch das Abtastlicht eine höhere Stabilität aufweisen.

zurückzuführen. Die spektrale Signatur entspricht jeweils der von Riboflavin im angeregten S_1 -Zustand und die langlebigen Signale, die von freiem Riboflavin in der Lösung stammen, konnten nicht bei allen Proben beobachtet werden. Die transienten Spektren weisen auch spektrale Unterschiede zu den Ergebnissen für Riboflavin in Lösung auf. Besonders auffällig ist das Fehlen der stimulierten Emission in den transienten Daten von HsDod-gebundenem Riboflavin. Dies ist ein Indiz dafür, dass sich Riboflavin nicht im ersten angeregten Zustand (S_1) befindet. Bereits innerhalb der Zeitauflösung muss daher eine Entvölkerung des angeregten Zustands stattfinden. Entsprechend können auch die positiven Absorptionsänderungen nicht Übergängen aus dem S_1 -Zustand in höher angeregte Zustände zugeordnet werden. Die positiven Signale reichen zudem nicht so weit in den roten Spektralbereich wie für freies Riboflavin, entsprechend liegen die HsDod-gebundenen Riboflavinmoleküle bereits bei sehr kurzen Verzögerungszeiten nicht in dem gleichen Zustand vor wie ungebundenes Riboflavin. Weiterhin ist zu erwähnen, dass bei HsDod-gebundenem Riboflavin das positive Differenzsignal um 500 nm eine

längere Lebensdauer besitzt als das breite positive Signal zwischen 550 nm und 750 nm.

Die Unterschiede in den Lebensdauern der Differenzsignale für Riboflavin in Lösung und gebunden in HsDod werden besonders deutlich, wenn man die transienten Absorptionsänderungen bei einzelnen Wellenlängen vergleicht. In Abbildung 4.8 sind daher die transienten Absorptionsänderungen nach Photoanregung bei 388 nm für vier ausgewählte Abtastwellenlängen gezeigt. Im Bereich des Grundzustandsbleichens (451 nm) ist besonders deutlich die schnelle Wiederbesetzung des Ausgangszustands bei HsDod-gebundenem Riboflavin zu beobachten. Bei 507 nm und 675 nm sieht man die deutlich kürzere Lebensdauer der positiven Differenzsignale von HsDod-gebundenem Riboflavin und bei 571 nm wird neben der verkürzten Lebensdauer der Differenzsignale auch das Fehlen der stimulierten Emission deutlich. Des Weiteren fällt auf, dass die Signale des proteingebundenen Riboflavins, trotz identischer Versuchsbedingungen und ähnlicher Konzentration des Chromophors, kleiner sind. Beim Vergleich der verschiedenen transienten Signale von HsDod-gebundenem Riboflavin zeigt sich außerdem, dass das Differenzsignal bei 507 nm langsamer zerfällt als die übrigen Signale. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 4.9 die Absorptionsänderungen im Bereich des Grundzustandsbleichens (448 nm), der positiven Absorptionsänderungen zwischen 550 nm und 750 nm (576 nm und 640 nm) und des längerlebigen Signals um 500 nm (504 nm) entsprechend ihrer Absorptionsänderung direkt nach Photoanregung skaliert und miteinander verglichen. Das Signal bei 504 nm zeigt eine deutlich andere Kinetik als die übrigen Signale.

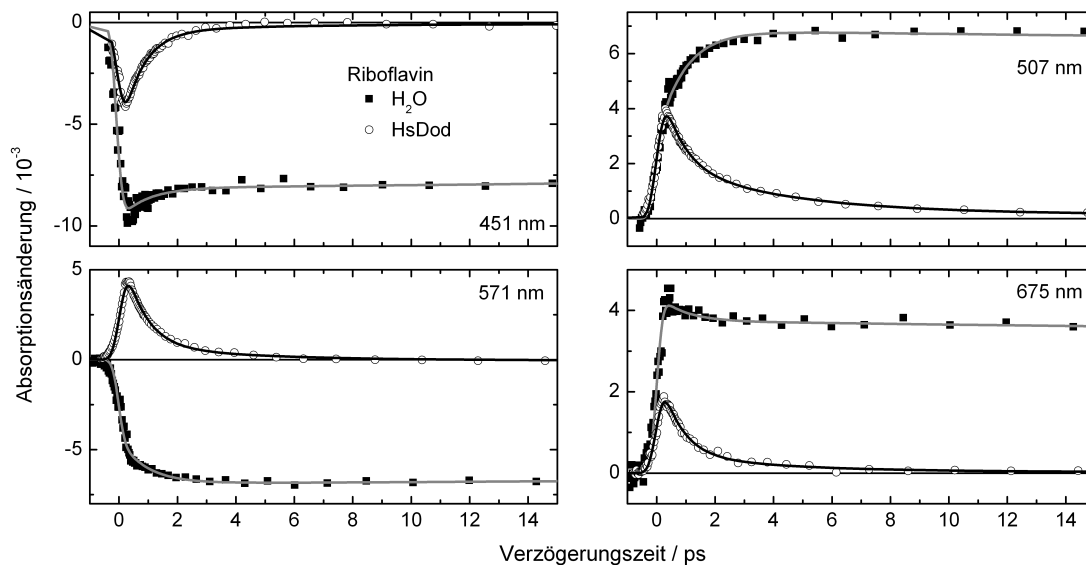


Abbildung 4.8: Transiente Absorptionsänderung für HsDod-gebundenes Riboflavin und Riboflavin in wässriger Pufferlösung (pH 7,5) bei vier ausgewählten Wellenlängen nach Anregung bei 388 nm. Die Spektren wurden mit Hilfe der statischen Absorptionsspektren auf die Absorption bei 388 nm normiert. Die angegebenen Absorptionsänderungen beziehen sich auf HsDod-gebundenes Riboflavin.

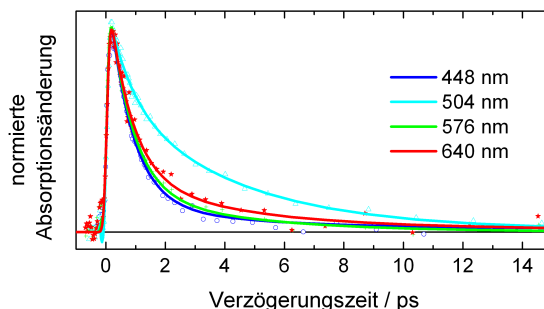


Abbildung 4.9: Transiente Absorptionsänderung für HsDod-gebundenes Riboflavin bei vier ausgewählten Wellenlängen nach Anregung bei 388 nm. Das Signal bei 448 nm wurde mit dem Faktor -1 multipliziert und alle Signale anhand der Absorptionsänderung direkt nach der Photoanregung normiert.

Einfluss der Anregungswellenlänge

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Anregungswellenlänge auf die beobachtete Dynamik ausübt, wurde Riboflavin sowohl in Lösung als auch eingebaut in HsDod mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen angeregt und transiente Spektren aufgenommen. In Abbildung 4.10 sind stellvertretend die Ergebnisse für HsDod-gebundenes Riboflavin gezeigt. Für freies Riboflavin und auch für Dodecin-Proteine mit Riboflavin aus anderen Spezies zeigten sich die gleichen Trends.

Die Anregungswellenlängen lagen hierbei um 345 nm ($S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang), 388 nm (rote Flanke des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs), 440 nm ($S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang) und 475 nm (rote Flanke des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs). Es zeigte sich, dass im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses keine signifikanten Unterschiede in den transienten Spektren auszumachen sind. Lediglich bei einer Anregung bei 345 nm beobachtet man im Bereich des Grundzustandsbleichens (465 nm) Abweichungen von den Ergebnissen der Messungen mit anderen Anregungswellenlängen. Hierfür könnte eine leichte Verschiebung der Abtastkanäle die Ursache sein, da bei dieser Messung CaF_2 -Weißlicht zur Abtastung der Probe eingesetzt wurde und die Einstellung des Gitters im Spektrometer somit eine andere war, bzw. die Kalibrierung auf einen anderen Messkanal erfolgte. Die ähnlichen Ergebnisse der Experimente mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen sprechen für einen schnellen Übergang aus dem S_2 - in den S_1 -Zustand innerhalb der Zeitauflösung des Experiments und stehen in Einklang mit Ergebnissen an Flavinen in Lösung und anderen Flavoproteinen [68, 123]. Aufgrund der Unabhängigkeit der transienten Spektren von der Anregungswellenlänge, bei einer Anregung im Bereich des $S_0 \rightarrow S_1$ - und $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs, wurden für die Auswertung und Interpretation der Daten stets jene mit dem besten Signal-zu-Rausch-Verhältnis ausgewählt. In den meisten Fällen wurden die transienten Spektren bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm verwendet, welches der Frequenzverdoppelten der Laserfundamentalen entspricht.

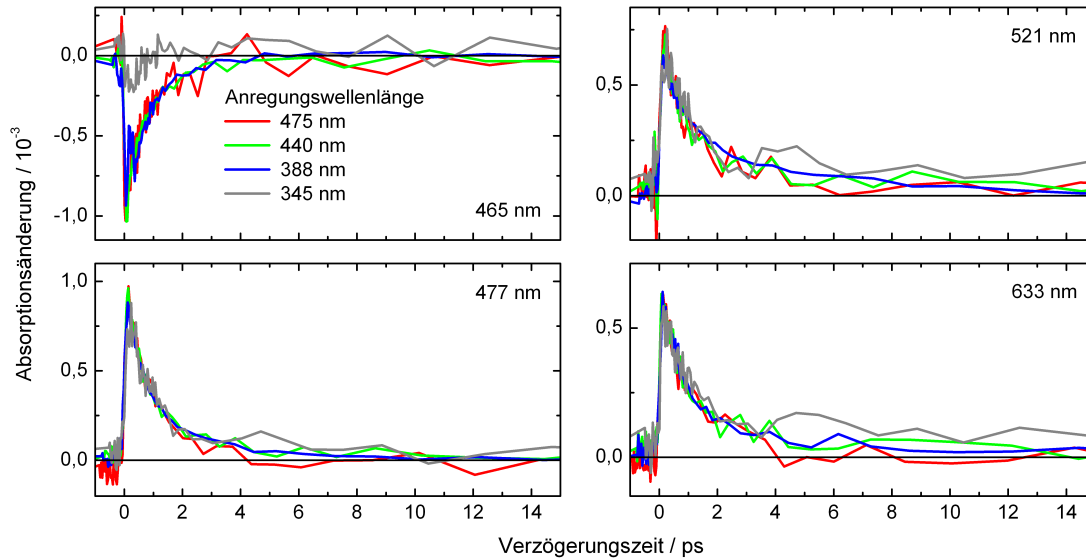


Abbildung 4.10: Transiente Absorptionsänderungen für HsDod-gebundenes Riboflavin bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen für unterschiedliche Anregungswellenlängen (475 nm, 440 nm, 388 nm und 345 nm). Die transienten Daten wurden so normiert, dass sie auf möglichst vielen Kanälen vergleichbare Absorptionsänderungen besitzen. Die angegebenen Absorptionsänderungen beziehen sich hierbei auf die Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm.

Variation der Anregungsintensität

Um sicherzustellen, dass die Daten frei von Artefakten aufgrund von zu hoher Anregungsintensität sind, wie z. B. Zweiphotonenprozessen oder der gleichzeitigen Anregung von beiden Flavinen in einer Bindetasche, wurde die Probe mit unterschiedlichen Anregungsintensitäten bei gleicher Anregungswellenlänge untersucht. In Abbildung 4.11 sind die transienten Spektren für HsDod-gebundenes Riboflavin bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm und einer Intensität von 45 nJ bzw. 90 nJ gezeigt. Im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sind keine Unterschiede auszumachen und die Ergebnisse stimmen auch mit denen bei anderen Anregungsintensitäten bis zu 100 nJ pro Puls überein. Somit können bei den Ergebnissen der transienten Messungen Effekte durch zu hohe Anregungsintensitäten ausgeschlossen werden.

Globale Fitanalyse

Um die Zuordnung der beobachteten Dynamik zu bestimmten Prozessen zu ermöglichen wurden die Daten für HsDod-gebundenes Riboflavin einer globalen Fitanalyse unterzogen. Für eine zufriedenstellende Anpassung einer Fitfunktion an die Daten waren insgesamt vier Zeitkonstanten notwendig. Diese unterscheiden sich nicht für unterschiedliche Anregungswellenlängen und sind auch für die Messungen mit Saphir- und CaF₂-Weißlicht identisch.

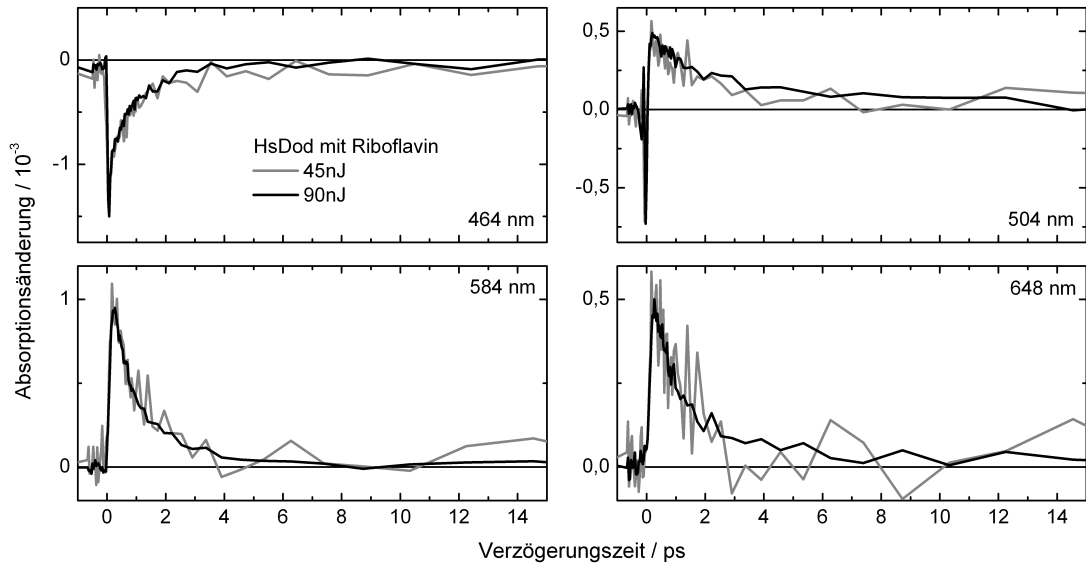


Abbildung 4.11: Transiente Absorptionsänderung für HsDod-gebundenes Riboflavin bei vier ausgewählten Wellenlängen nach Photoanregung bei 440 nm für unterschiedliche Anregungsintensitäten (45 nJ bzw. 90 nJ pro Puls). Die Spektren wurden nicht von Lösungsmittelleffekten bereinigt. Die angegebenen Absorptionsänderungen beziehen sich auf die Messung mit 90 nJ pro Puls. Die Absorptionsänderungen nach Anregung mit 45 nJ wurden mit dem Faktor 2 multipliziert.

Eine kurze Zeitkonstante τ_1 lag unterhalb der Zeitaufösung des Experiments und wird im Folgenden nicht näher diskutiert. Sie ist von kohärenten Effekten beeinflusst, die durch die zeitliche Überlappung von Anregungs- und Abtastpuls in der Probe zu Stande kommen. Des Weiteren werden in diesem Zeitbereich Wellenpaketsbewegungen und dynamische Stokesverschiebungen erwartet, die nicht mit Hilfe monoexponentieller Zerfälle beschrieben werden können. Dennoch ist τ_1 für eine Anpassung der Fitfunktion an die Datensätze notwendig. Zwei weitere Zeitkonstanten $\tau_2 = 0,9$ ps und $\tau_3 = 4$ ps wurden für eine Anpassung des globalen Fits an die Daten benötigt und beschreiben die Dynamik des angeregten Riboflavins eingebaut in das HsDod-Protein. Die entsprechenden zerfallassozierten Spektren (DAS, engl. **d**ecay **a**ssoiated **s**pectra) sind in Abbildung 4.12 gezeigt. Eine vierte lange Zeitkonstante τ_∞ (länger als die maximale Verzögerungszeit des Experiments) wurde für die Beschreibung von Signalen bei maximaler Verzögerungszeit (1,5 ns) benötigt. Im Falle von HsDod-gebundenem Riboflavin liegen diese Signale in der Größenordnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und werden daher als vernachlässigbar erachtet.

Die zerfallassozierten Spektren (Abbildung 4.12) der Zeitkonstanten τ_2 zeigen negative Amplituden mit einem Minimum bei etwa 430 nm. Somit beschreibt diese Zeitkonstante den Zerfall des negativen Signals des Grundzustandsbleichens im spektralen Bereich zwischen 400 nm und 480 nm. Die positiven Amplituden oberhalb von 490 nm, mit einem Maximum um 580 nm, und unterhalb von 400 nm beschreiben den Zerfall der

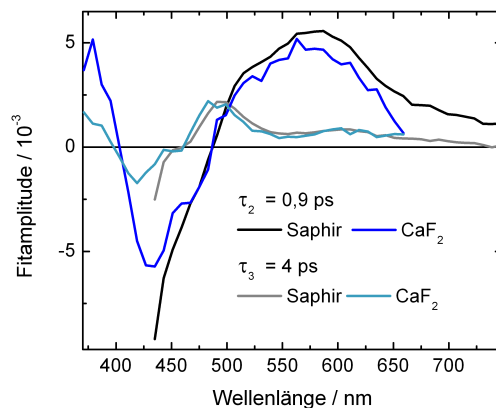


Abbildung 4.12: Zerfallsspektren der beiden Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 aus der globalen Fitanalyse der Daten von HsDod-gebundenem Riboflavin nach einer Anregung bei 388 nm und Saphir-Weißlicht, sowie nach Photoanregung bei 475 nm und CaF₂-Weißlicht. Die angegebenen Amplituden entsprechen den Ergebnissen für Saphir-Weißlicht zu Abtastung. Die Amplituden der Messung mit CaF₂-Weißlicht wurden mit einem konstanten Faktor multipliziert, der sich aus der Anpassung der transienten Absorptionsänderungen für beide Messungen ergibt.

positiven Differenzsignale in diesen Spektralbereichen. Die Zeitkonstante τ_2 beschreibt somit den Zerfall eines Zwischenprodukts des Lösungsmechanismus und gleichzeitig die Wiederbesetzung des Ausgangszustands.

Für die Zeitkonstante τ_3 zeigen die entsprechenden zerfallsspektren negative Amplituden zwischen 400 nm und 450 nm mit einem Minimum bei etwa 420 nm. Diese Zeitkonstante lässt sich somit ebenfalls dem Zerfall des Signals des Grundzustandsbleichens zuordnen. Die positiven Amplituden unterhalb von etwa 395 nm, sowie von 460 bis 720 nm zeigen den Zerfall positiver Absorptionsänderungen in diesen Spektralbereichen an. Das Maximum um 490 nm liegt hierbei genau bei dem Nulldurchgang des zerfallsspektren von τ_2 . Somit ist der Zerfall des Signals im Bereich um 490 nm dominiert durch die längere Zeitkonstante τ_3 und spiegelt den langsameren Zerfall der positiven Signale in diesem Spektralbereich im Verhältnis zu dem schnelleren Zerfall der Signale oberhalb von etwa 530 nm wieder. Hier dominiert die Zeitkonstante τ_2 den Zerfall der Differenzsignale.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass HsDod dazu beiträgt, den reaktiven angeregten Zustand von Riboflavin nach Photoanregung schneller als die Zeitauflösung des Experiments (etwa 200 fs) zu entvölkern und das Riboflavinmolekül innerhalb von etwa 10 ps wieder in den anfänglichen unreaktiven Grundzustand zu überführen. Dies trägt dazu bei, unerwünschte Photoreaktionen von Riboflavin zu verhindern. Zudem wird Riboflavin vor Photodegradation bewahrt.

Ultraschneller Elektronentransfer

Das Fehlen einer stimulierten Emission in den transienten Daten von HsDod-gebundenem Riboflavin zeigt, dass der angeregte Zustand bereits innerhalb der Zeitauflösung des Experiments entvölkert wird. Auf der Grundlage der Ergebnisse für andere RfbP wird ein schneller Elektronentransfer von einem Tryptophanrest auf das photoangeregte Riboflavin diskutiert. Durch einen anschließenden Elektronenrücktransfer gelangt das System zurück in den Ausgangszustand. Dieser Mechanismus ist schematisch in Abbildung 4.13 gezeigt.

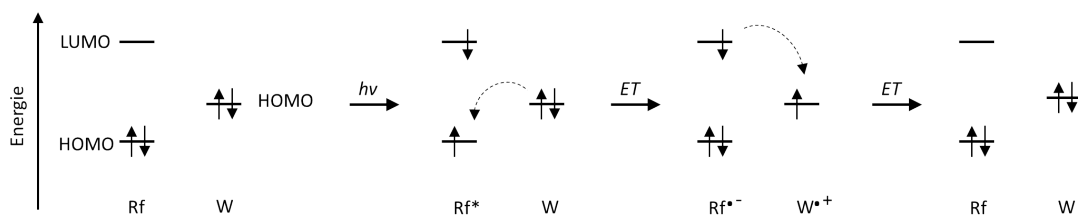


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung eines Elektronentransferprozesses in HsDod von Tryptophan auf das photoangeregte Riboflavin und des anschließenden Elektronenrücktransfers. Dargestellt sind die beteiligten Energieniveaus von Riboflavin (Rf) und Tryptophan (W) sowie die Elektronen.

Mit Hilfe der von Marcus aufgestellten Theorie zum Elektronentransfer [124, 125] und der von Moser und Dutton semiempirisch aufgestellten Formel (Formel 4.3) [126–128], welche die Elektronentransferrate k_{et} in Abhängigkeit von dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor R (in Å), der freien Reaktionsenthalpie ΔG^0 (in eV) und der Reorganisationsenergie λ (in eV) beschreibt, kann die Rate für einen Elektronentransfer von Tryptophan auf das photoangeregte Riboflavin abgeschätzt werden. Die Rate wird hierbei als Produkt aus zwei Termen betrachtet: Der erste basiert auf der Kopplung der Wellenfunktionen des Elektronendonors und -akzeptors. Er beschreibt einen exponentiellen Abfall der Elektronentransferrate mit zunehmendem Abstand und ist proportional zu $e^{-\beta R}$, wobei β ein materialabhängiger Parameter und proportional zu der Wurzel der zu überwindenden Energiebarriere ist. Der zweite Term ist von der Reorganisationsenergie λ und der Triebkraft für den Elektronentransfer ΔG^0 abhängig.

$$k_{et} = \frac{2\pi}{\hbar} V_{(R)}^2 \cdot FC \quad (4.1)$$

mit

$$V_{(R)}^2 = V_{(0)}^2 e^{-\beta R} \quad \text{und} \quad FC = \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda kT}} \cdot \exp\left(\frac{-(\Delta G - \lambda)^2}{4\lambda kT}\right) \quad (4.2)$$

wobei $V_{(R)}^2$ die elektronische Kopplung zwischen Edukt- und Produktzustand, $V_{(0)}^2$ die maximale elektronische Kopplung, FC die Franck-Condon-gewichtete Zustandsdichte, \hbar das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum, k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur sind. Durch Logarithmieren und nach den Ergebnisse von Moser und Dutton erhält man [127]:

$$\log_{10}k_{et} = 13 - 0,6(R - 3,6) - \frac{3,1(\Delta G^0 + \lambda)^2}{\lambda} \quad (4.3)$$

Im ersten Term stellt 13 die Geschwindigkeit des Elektronentransfers bei van-der-Waals-Kontakt dar. Dieser liegt bei etwa $3,6 \text{ \AA}$. Der zweite Term beschreibt den exponentiellen Abfall der Rate mit zunehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Der Koeffizient 0,6 entspricht hierbei einen β -Wert von $1,4 \text{ \AA}^{-1}$, ein Wert, der als gute Abschätzung für Elektronentransferprozesse in Proteinen gilt [129]. Der dritte Term beschreibt die Franck-Condon gewichtete Zustandsdichte. Der Koeffizient 3,1 umfasst die Konstanten für die quantifizierten Kernbedingungen bei Raumtemperatur [130].

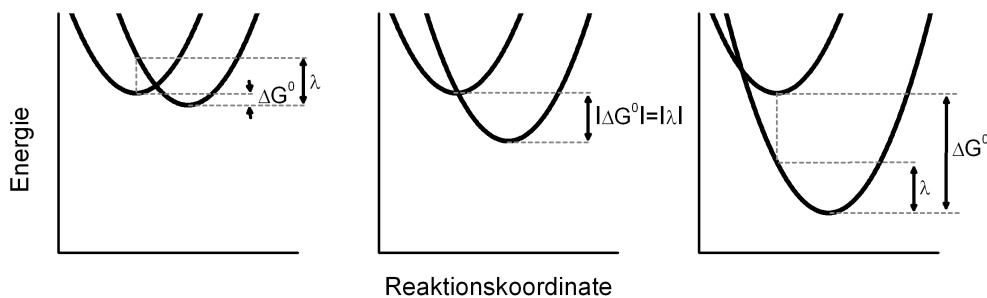


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der Potentialflächen von drei verschiedenen Fällen von Elektronentransferreaktionen mit gleicher Reorganisationsenergie λ , aber verschiedenen freien Reaktionsenthalpien ΔG^0 . Links ist der Fall des normalen Marcus-Bereichs gezeigt, wenn die Reorganisationsenergie größer als die freie Reaktionsenthalpie des Elektronentransfers ist. In der Mitte ist der Fall der optimalen Elektronentransferrate gezeigt, wenn die Reorganisationsenergie der Differenz der freien Gibbsenergie entspricht und rechts ist der invertierte Fall der Marcus-Theorie gezeigt, der gilt, wenn die freie Reaktionsenthalpie größer als die Reorganisationsenergie ist.

Mit der bekannten Energiedifferenz zwischen dem S_0 - und dem S_1 -Zustands des Riboflavins von $2,35 \text{ eV}$ [4], sowie den elektrischen Potentialen von Riboflavin/Riboflavin $\bullet^- \approx -0,8 \text{ V}$ [131] und Tryptophan/Tryptophan $\bullet^+ \approx 1,15 \text{ V}$ [132] gegen eine Normalwasserstoffelektrode kann für die Elektronentransferreaktion von einem Tryptophanrest auf ein photoangeregtes Flavin ein ΔG^0 von $-0,4 \text{ eV}$ errechnet werden. Der Abstand zwischen dem Elektronendonator Tryptophan und dem Elektronenakzeptor Riboflavin beträgt im HsDod etwa $3,4 \text{ \AA}$. Riboflavin und Tryptophan stehen somit in van-der-Waals-Kontakt. Damit erhält man nach Formel 4.3 für die „optimale“ Elektronentransferrate, in diesem Fall ist $\lambda = -\Delta G^0$ und der letzte Term wird Null, einen Wert von $1 \cdot 10^{13} \text{ s}^{-1}$. Dies entspricht einer Zeitkonstante von 100 fs und liegt somit unterhalb der Zeitauflösung des in dieser Arbeit verwendeten Experiments. Höhere Werte von λ führen entsprechend zu längeren Zeitkonstanten, so erhält man beispielsweise mit $\lambda = 0,7 \text{ eV}$, was ein typischer Wert für Elektronentransferreaktionen innerhalb eines Proteins ist [128, 133, 134], eine Zeitkonstante von 250 fs . In Abbildung 4.14 sind die unterschiedlichen Fälle der Marcus-Theorie schematisch dargestellt. Den schnellsten Elektronentransfer beobachtet man, wenn $-\Delta G^0 = \lambda$. Im Falle des normalen Bereichs ist $-\Delta G^0 < \lambda$ und die Elektronen-

transferrate nimmt mit zunehmendem ΔG^0 zu. Für $-\Delta G^0 > \lambda$ spricht man von dem invertierten Bereich und die Elektronentransferrate nimmt mit zunehmendem ΔG^0 ab.

Die Berechnungen zeigen, dass ein ultraschneller Elektronentransfer von einem Tryptophanrest auf ein Riboflavin im ersten elektronisch angeregten Zustand innerhalb von wenigen 100 fs ablaufen kann und somit schneller als die Zeitauflösung des Experiments sein könnte. Dadurch wäre dieser Prozess in unserem Experiment nur schwer aufzulösen. Die berechnete Elektronentransferrate steht in Einklang damit, dass direkt nach der Photoanregung keine stimulierte Emission zu beobachten ist und somit keine Riboflavinmoleküle im ersten angeregten Zustand vorliegen, sondern wahrscheinlich in einem ladungsseparierten Zustand. Für den Elektronenrücktransfer wird erwartet, dass dieser aufgrund der hohen Differenz der freien Reaktionsenthalpien des ladungsseparierten Zustands und des Ausgangsgrundzustands von 1,95 eV im invertierten Marcus-Bereich liegt und somit trotz der hohen Triebkraft langsamer abläuft als der initiale Elektronentransfer. Eine Beteiligung von Triplett-Zuständen an dem Lösungsmechanismus wird aufgrund der schnellen und effektiven Entvölkerung des angeregten Zustands des Flavins im Dodecin über andere Deaktivierungspfade ausgeschlossen. Ein möglicher Elektronentransfermechanismus für HsDod-gebundenes Riboflavin wurde auch von D. Raststätter im Rahmen seiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von A. Dreuw (Goethe-Universität, Frankfurt am Main) mittels quantenchemischer Rechnungen untersucht [135]. Dabei wurde die Dodecin-Bindetasche zunächst auf die Flavine und Tryptophanreste reduziert, später wurde auch die Proteinumgebung mit einbezogen. Es zeigte sich, dass die wichtigsten ladungsseparierten Zustände durch einen Elektronentransfer von einem Tryptophan auf ein Flavin zu Stande kamen.

Paralleler oder sequentieller Mechanismus

Auf den ersten Blick hat es den Anschein, dass es sich bei den positiven Differenzsignalen um 500 nm und zwischen 550 nm und 700 nm um zwei voneinander getrennte Signale handelt, die beide direkt nach der Photoanregung zu beobachten sind. Dies würde dafür sprechen, dass zwei unterschiedliche Spezies mit unterschiedlichen Zeitkonstanten zerfallen. Dabei kann es sich entweder um zwei Teile des Proteins mit unterschiedlichen Absorptionsspektren und unterschiedlichen Lebensdauern handeln (beispielsweise eine Flavinemichinon- und eine Tryptophanradikal-Spezies) oder es sind die Absorptionsspektren der Zwischenprodukte von zwei parallel ablaufenden Mechanismen.

Bei näherer Betrachtung stellt man fest, dass es sich bei dem Signal um 500 nm auch um eine Überlagerung des breiten positiven Signals zu kurzen Verzögerungszeiten und dem schmalen positiven Signal um 500 nm zu längeren Verzögerungszeiten handeln kann. Somit wäre auch ein sequentieller Mechanismus denkbar. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 4.15 ein möglicher paralleler und sequentieller Mechanismus schematisch dargestellt.

Um die Möglichkeit eines sequentiellen Mechanismus näher zu untersuchen soll von dem transienten Signal bei 507 nm der Anteil, der von dem kurzlebigeren, breiten, positiven Signal stammt, abgezogen werden. Der Zerfall des Signals bei 675 nm ist dominiert

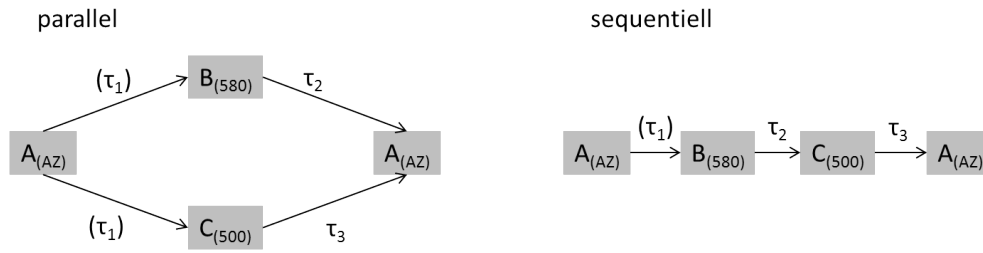


Abbildung 4.15: Schematische Darstellungen eines möglichen parallelen (links) und eines sequentiellen Verlaufs der Prozesse (rechts) in HsDod nach Photoanregung des eingebauten Riboflavins. $A_{(AZ)}$ steht für den Ausgangszustand. B und C stellen die Zwischenprodukte dar, die Zahlen in Klammern stehen für die Wellenlänge der zugehörigen Differenzsignale.

von der schnellen Zeitkonstante τ_2 . Um die transiente Absorptionsänderung bei 675 nm sinnvoll von denen bei 507 nm abziehen zu können, müssen die Daten entsprechend skaliert werden. Um den Anteil des kurzlebigeren, breiten, positiven Signals bei 507 nm abschätzen zu können, wurde an das zerfallassozierte Spektrum der Zeitkonstante τ_2 zwischen 500 nm und 750 nm eine Summe aus zwei Gauß-Funktionen angenähert (Abbildung 4.16). Die Gauß-Funktion mit der negativen Amplitude entspricht dabei der Absorptionsabnahme des Ausgangszustands A und die mit der positiven Amplitude entspricht der Absorptionszunahme durch den Zustand B, der mit der Zeitkonstanten τ_2 zerfällt.

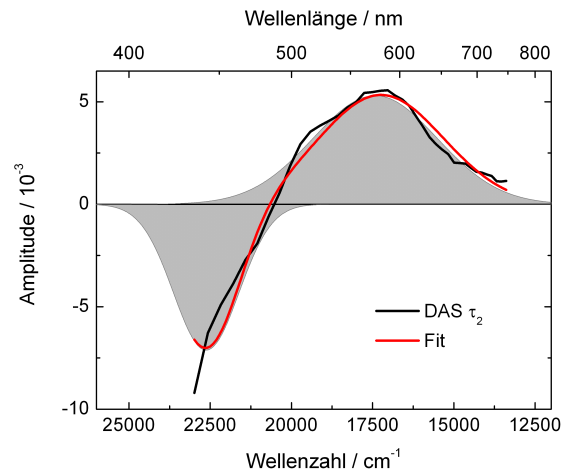


Abbildung 4.16: Das zerfallassozierte Spektrum (DAS, schwarz) der τ_2 -Zeitkonstante zwischen 430 nm und 740 nm von HsDod-gebundenem Riboflavin kann mit Hilfe einer Summe aus zwei Gauß-Funktionen beschrieben werden. Die entsprechende Fitfunktion ist in rot gezeigt, die beiden am Fit beteiligten Gauß-Kurven in grau.

Anhand dieser Gauß-Funktion kann der Anteil der Zeitkonstante τ_2 an dem Zerfall des Signals bei 507 nm abgeschätzt und die Absorptionsänderung bei 675 nm entsprechend skaliert werden. Die skalierte Kurve kann nun von dem transienten Signal bei 507 nm abgezogen werden (Abbildung 4.17).

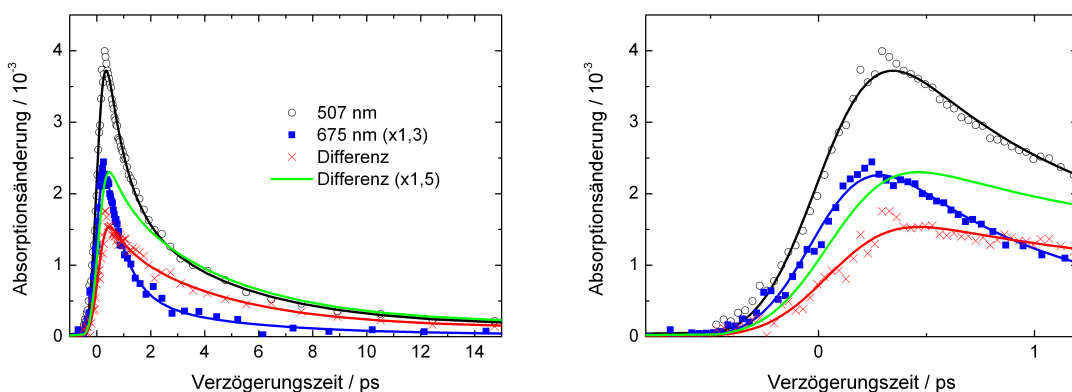


Abbildung 4.17: Die transienten Absorptionsänderungen bei 675 nm wurden anhand der Gauß-Kurve aus Abbildung 4.16 (Anteil mit positiver Amplitude, entspricht dem Faktor 1,3) normiert und von den transienten Absorptionsänderungen bei 507 nm abgezogen. Die Differenz (rot) wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit den Signalen bei 675 nm mit dem Faktor 1,5 multipliziert (grün). Links sind die transienten Daten für Verzögerungszeiten zwischen -1 ps und 15 ps gezeigt, rechts ist der Bereich um den Zeitnullpunkt zwischen -0,8 ps und 1,2 ps vergrößert dargestellt.

Die Differenz aus den transienten Absorptionsänderungen bei unterschiedlichen Wellenlängen entspricht nun der Dynamik der Spezies C, die mit der Zeitkonstante τ_3 zerfällt. Man erkennt, dass der Anstieg der Kurve etwas langsamer ist, als für die transiente Absorptionsänderung bei 675 nm. Dies spricht dafür, dass die Spezies C etwas später gebildet wird. Nehmen wir an, die Reaktion laufe nach dem Schema der sequentiellen Reaktion aus Abbildung 4.15 ab. Die ersten Schritte der Reaktion finden innerhalb der Zeitaufösung statt und können mit der Zeitkonstanten τ_1 zusammengefasst werden. Bei einer Folgereaktion des Typs $B \xrightarrow{\tau_2} C \xrightarrow{\tau_3} A$ kann der zeitliche Verlauf der Konzentration von C $c(C)$ mittels der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$c(C) = k_2 c(B_0) \frac{e^{-k_2 t} - e^{-k_3 t}}{k_3 - k_2} \quad (4.4)$$

wobei $c(B_0)$ die Konzentration von B zu Beginn der Reaktion (direkt nach der Photoanregung), k_2 die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion $B \rightarrow C$ ($k_2 = 1/\tau_2$) und k_3 die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion $C \rightarrow A$ ($k_3 = 1/\tau_3$) ist.

Der transiente Verlauf der Differenzkurve (Abbildung 4.17) kann jedoch nicht mit den Geschwindigkeitsgesetzen einer Folgereaktion erster Ordnung beschrieben werden. Es ist nicht möglich eine geeignete Fitfunktion mit Hilfe der Formel für eine Folgereaktion erster Ordnung (Formel 4.4) an die Differenzkurve anzupassen. Dies spricht gegen eine

Folgereaktion, bei der Substanz C mit der Geschwindigkeitskonstante τ_2 aus Substanz B gebildet wird und dann mit der Zeitkonstante τ_3 wieder zerfällt. Somit deuten die Ergebnisse auf einen parallelen Mechanismus hin, bei dem die beiden Substanzen B und C parallel gebildet werden und jeweils mit der Zeitkonstante τ_2 oder τ_3 zerfallen. Die Differenzkurve in Abbildung 4.17 legt jedoch nahe, dass die Zwischenprodukte der beiden Reaktionsmechanismen nicht zeitgleich entstehen. Aufgrund der vielen Einflüsse, die die Signale rund um den Zeitnullpunkt beeinflussen, wie beispielsweise die Kreuzkorrelation, und der spektralen Überlagerung der einzelnen Differenzbanden und der damit verbundenen schwierigen Unterscheidung der einzelnen Kinetiken wird ein sequentieller Mechanismus nicht gänzlich ausgeschlossen.

Zuordnung der Differenzbanden

Eine Zuordnung der Zeitkonstanten zu bestimmten Prozessen ist selbst mit Hilfe der zerfallassozierten Spektren nicht einfach realisierbar, da sich die Spektren vieler in Frage kommender Spezies in diesem Spektralbereich überschneiden. Nimmt man einen Elektronentransfer von einem Tryptophanrest auf das photoangeregte Riboflavin an, so würde ein anionisches Riboflavinsemichinon und ein kationisches Tryptophanradikal erzeugt werden. Ähnliche Elektronentransferprozesse wurden bereits bei einer Reihe von anderen Flavoproteinen beobachtet, so z. B. bei RfbP aus Hühnereiweiß [3, 4], den verschiedenen BLUF-Domänen [98, 101] und Cryptochromen [136]. Die Spektren der beiden dabei entstehenden Spezies sind hinreichend aus der Literatur bekannt. So besitzt das kationische Tryptophanradikal ein Absorptionsmaximum bei 560 nm [137, 138]. Dies würde dem zerfallassozierten Spektrum der τ_2 -Zeitkonstanten oberhalb von 500 nm entsprechen. Somit könnte diese Zeitkonstante den Zerfall des kationischen Tryptophanradikals anzeigen. Für die Signatur der Amplitude von τ_2 kommen aber auch noch andere Spezies in Frage. Das Spektrum eines neutralen Flavosemichinons ähnelt abseits des Grundzustandsbleichens (oberhalb von etwa 500 nm) ebenfalls der spektralen Signatur dieses zerfallassozierten Spektrums [139–144]. Das neutrale Riboflavinsemichinon besitzt zwischen 400 nm und 700 nm mehrere breite Absorptionsbanden, die einander überlagern, so dass diese Spezies insgesamt in diesem Spektralbereich ein breites Absorptionsspektrum aufweist. Ein neutrales Riboflavinsemichinon könnte bei einem Elektronentransfer gekoppelt mit einem Protonentransfer auf das Flavin gebildet werden. Ein Elektronentransfer gefolgt von einem Protonentransfer ist unter anderem aus BLUF-Domänen bekannt [98, 100, 101] und wurde auch für das RfbP aus Hühnereiweiß diskutiert [116]. Der pK_A -Wert eines neutralen Flavosemichinons liegt bei 8,3, somit ist ein Protonentransfer bei pH-Werten $< 8,3$ durchaus wahrscheinlich [143]. Protonentransferprozesse in Proteinen können mitunter sehr schnell – auf sub-100 fs-Zeitskalen – verlaufen und können somit unterhalb der Zeitauflösung des verwendeten Experiments liegen [145]. Selbstverständlich kann sich das Differenzspektrum auch aus verschiedenen Spezies mit ähnlichen Lebensdauern zusammensetzen. Das Differenzsignal kann bei einem Elektronentransfer-Prozess sowohl Beiträge des Donors (Tryptophan) als auch des Akzeptors (Riboflavin) enthalten.

Auch für die Spezies, die mit der Zeitkonstante τ_3 zerfällt, kommen unterschiedliche Kandidaten in Frage. So weist z. B. die anionische semichinoide Form des Flavins Absorptionsmaxima bei 480 nm, 400 nm und 350 nm auf [139–143]. Das neutrale Tryptophanradikal besitzt ein Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm [138]. Denkbar ist auch, dass die Zeitkonstante τ_2 den Zerfall des Tryptophanradikals beschreibt, während die Zeitkonstante τ_3 zum Zerfall einer Riboflavinsemichinonspezies gehört. Allerdings stellt sich dann die Frage, woher der Tryptophanrest das Elektron erhält, während das Flavin noch etwas länger in seinem radikalischen Semichinonzustand verbleibt. Die spektrale Signatur könnte auch einer bathochrom verschobenen Absorptionsbande eines oxidierten Flavins zugeordnet werden. Eine ähnliche Signatur kann beispielsweise im Falle von BLUF-Domänen für den langlebigen Signalzustand beobachtet werden [98]. Hierbei kommt die bathochrome Verschiebung durch ein verändertes Wasserstoffbrückennetzwerk zu Stande. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich nach der Photoanregung die Umgebung für das zweite Riboflavinmolekül in der Bindetasche, welches sich im elektronischen Grundzustand befindet, ändert, so dass das Absorptionsspektrum spektral verschoben wird und zu den beobachteten Differenzsignalen führt. Die spektrale Signatur mit einer zum Grundzustandsbleichen bathochrom verschobenen positiven Absorptionsänderung passt auch zu einem heißen oxidierten Flavin im Grundzustand. Der Zerfall des Signals würde dann einem Kühlprozess entsprechen. Um eine Vorstellung der spektralen Signatur des Differenzspektrums eines schwingungsangeregten HsDod-gebundenen Riboflavins zu erhalten, wurde das UV/vis-Absorptionsspektrum um 1000 cm^{-1} (das entspricht in diesem Spektralbereich etwa 25 nm) bathochrom verschoben und davon das ursprüngliche Spektrum abgezogen. In Abbildung 4.18 ist in rot das entsprechende Differenzspektrum gezeigt. Der Vergleich mit den zerfallenssoziierten Spektren der Zeitkonstante τ_3 zeigt einen ähnlichen Verlauf der spektralen Signatur. Allerdings unterscheiden sich einige Maxima und Minima leicht in ihrer spektralen Lage und auch die Feinstruktur, die im Differenzspektrum bei 475 nm zu beobachten ist, ist in den zerfallenssoziierten Spektren nicht eindeutig auszumachen (siehe Abbildung 4.18). Größere oder kleinere Verschiebungen des Absorptionsspektrums führen nicht zu Differenzspektren, die größere Ähnlichkeit mit den zerfallenssoziierten Spektren aufweisen.

In den zerfallenssoziierten Spektren der Zeitkonstante τ_3 beobachtet man oberhalb von etwa 550 nm noch eine breite positive Amplitude. Diese kann, wie beispielsweise für BLUF-Domänen und D-Aminosäureoxidase diskutiert [98, 141, 146], durch Ladungstransferinteraktionen zu Stande kommen. Im Falle des HsDods kommen hierfür Wechselwirkungen zwischen den beiden Flavinen oder zwischen Flavin und Tryptophan in Frage.

Die Ergebnisse der transienten Spektroskopie an mit Riboflavin besetztem HsDod legen eine Entvölkerung des ersten angeregten Zustands innerhalb der Zeitauflösung des Experiments nahe, sowie eine vollständige Wiederbesetzung des Grundzustands innerhalb von etwa 10 ps. Neben einem Elektronentransfer- und Rücktransfer-Mechanismus zwischen dem angeregten Riboflavin und den Tryptophanresten in der Bindetasche kommen noch weitere Mechanismen in Frage. Vor allem die unterschiedlichen Lebensdauern

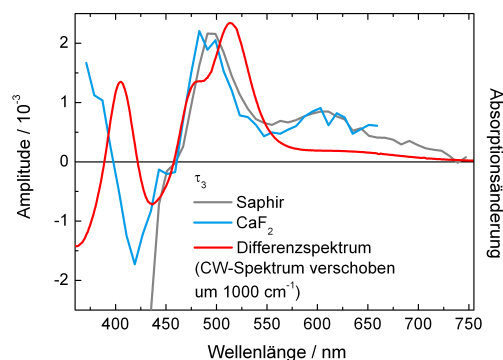


Abbildung 4.18: Differenzspektrum (rot) eines um 1000 cm^{-1} bathochrom verschobenen UV/vis-Absorptionsspektrums gegen das ursprüngliche Spektrum im Vergleich zu den zerfallenssoziierten Differenzspektren der Zeitkonstante τ_3 aus den Messungen mit verschiedenem Abtastweißlicht (grau, bzw. blau).

der positiven Differenzsignale zeigen, dass möglicherweise verschiedene Mechanismen, die parallel oder hintereinander ablaufen, bei der schnellen Rückkehr des Riboflavins in den Grundzustand eine Rolle spielen. Das Signal um 500 nm unterscheidet die Ergebnisse des HsDod-gebundenen Riboflavins von denen für RfbP aus Hühnereiweiß und erfordert eine genauere Betrachtung der Flavinderetasche in HsDod [3, 4, 109]. Neben einem Elektronentransfermechanismus kommen auch Protonentransfermechanismen oder Mechanismen, bei denen Elektron- und Protonentransfer gekoppelt sind, in Frage. Ein erheblicher Unterschied in der Bindetasche des Dodecins im Vergleich zu der des RfbP aus Hühnereiweiß ist die Ausbildung einer aromatischen Tetrade mit zwei Riboflavinen und zwei Tryptophanresten, während beim RfbP nur ein Riboflavin zwischen einem Tryptophan und einem Tyrosinrest gebunden ist. Dies ist insofern bemerkenswert, da bekannt ist, dass Flavine bei höheren Konzentrationen in Lösung zu Dimerbildung neigen und dabei ihre Fluoreszenz unterdrückt wird [76–80]. Daher ist es erforderlich, neben unterschiedlichen potentiellen Protonendonoren/-akzeptoren in der Bindetasche auch die Rolle des zweiten Flavins näher zu untersuchen.

4.4.2 HsDod mit Lumiflavin

Für die Untersuchung der Rolle der Ribitylkette kann die Eigenschaft von Dodecin genutzt werden, auch Lumiflavin in seine Bindetasche einzubauen. Wie bereits gezeigt, bindet Lumiflavin, das anstelle der Ribitylkette lediglich einen Methylrest besitzt, in der Bindetasche des HsDod in einer Position, die nur leicht von der des Riboflavins abweicht (siehe Kapitel 4.1.1). Mit Hilfe von HsDod-Proteinen, die mit Lumiflavin besetzt sind soll die Rolle der Ribitylkette sowie die Bedeutung der leicht veränderten Position des Flavins in der Bindetasche für den Lösungsmechanismus untersucht werden.

Statische Absorptionsspektroskopie

Abbildung 4.19 zeigt die statischen Absorptionsspektren von Lumiflavin in wässriger Pufferlösung (pH 7,5) und eingebaut in HsDod im Spektralbereich zwischen 310 nm und 570 nm. Die Absorptionsmaxima von Lumiflavin liegen in wässriger Pufferlösung bei 441 nm für den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang und bei 363 nm für den $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang. Im Vergleich dazu liegen die Absorptionsbanden im Falle des Riboflavins bei 445 nm und 373 nm (vergleiche Abbildung 4.6).

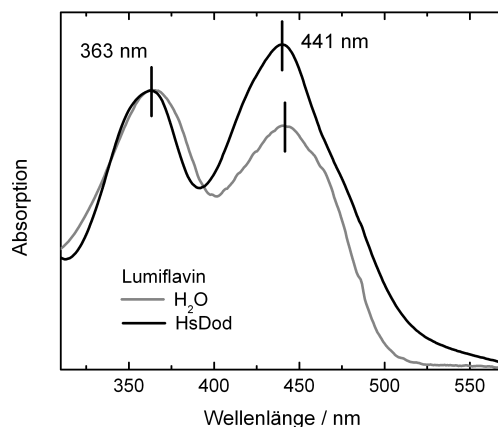


Abbildung 4.19: Statische Absorptionsspektren von Lumiflavin in Pufferlösung und gebunden in HsDod. Die Spektren wurden anhand der Absorption bei 363 nm normiert.

Lumiflavin zeigt ein ähnliches spektrales Verhalten wie Riboflavin beim Einbau in HsDod, was die Lage der Absorptionsbanden betrifft. Die Absorptionsbanden zeigen kaum spektrale Verschiebungen. Die Ausbildung einer Schulter im Bereich der langwelligeren Flanke der $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande ist lediglich anhand der höheren Absorption des eingebauten Lumiflavins im Bereich oberhalb von 500 nm auszumachen. Die geringen spektralen Veränderungen beim Einbau von Lumiflavin in HsDod sind, wie im Falle des Riboflavins, auf Wechselwirkungen in der Bindetasche wie Wasserstoffbrücken und aromatische $\pi\pi$ -Wechselwirkungen zurückzuführen. Bei der Intensität der Absorptionsbanden zeigen sich jedoch Unterschiede zum Riboflavin. Beim Einbau von Lumiflavin in die HsDod-Bindetasche zeigt die $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande im Vergleich zur $S_0 \rightarrow S_2$ -Bande eine Absorptionzunahme, während sie bei Riboflavin eine Abnahme aufweist (siehe Kapitel 4.4.1). Die Ursache hierfür könnten die unterschiedlichen Positionen der beiden Flavine in der Bindetasche sein (siehe hierzu Kapitel 4.1.1).

Transiente Absorptionsspektroskopie

Abbildung 4.20 zeigt die transienten Absorptionsänderungen für Lumiflavin in wässriger Lösung und gebunden in HsDod. Man erkennt, dass die Lebensdauer der Differenzsignale beim Einbau von Lumiflavin in HsDod, analog zu den Ergebnissen

für Riboflavin, verkürzt ist. Auch das Fehlen der stimulierten Emission um 550 nm für HsDod-gebundenes Lumiflavin ist zu beobachten. Die hier gezeigten Messungen wurden bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen durchgeführt. Für HsDod-gebundenes Lumiflavin wurde auch eine Messung mit einer Anregungswellenlänge von 475 nm durchgeführt, die das gleiche Ergebnis zeigt, aber ein schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist. Daher wurde die Messung von HsDod-gebundenem Lumiflavin bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm ausgewählt und im Folgenden mit einer Messung von HsDod-gebundenem Riboflavin, die unter den identischen Bedingungen aufgenommen wurde, verglichen. Hierzu sind transiente Absorptionsänderungen bei ausgewählten Wellenlängen in Abbildung 4.21 gezeigt.

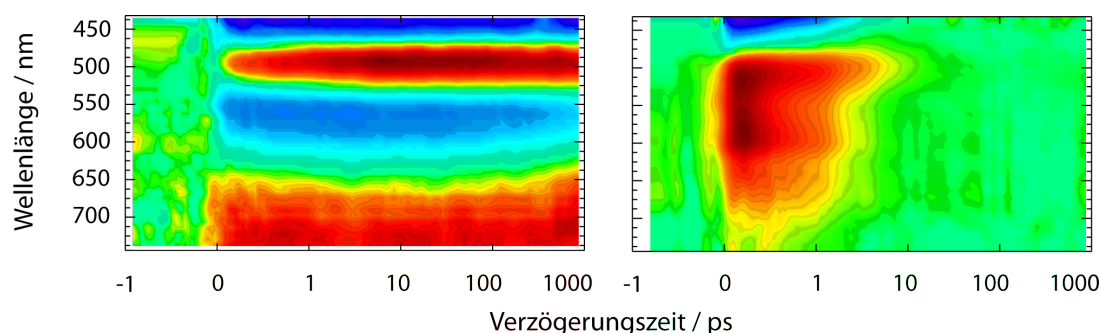


Abbildung 4.20: Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen für Lumiflavin in Pufferlösung (links, Anregungswellenlänge bei 475 nm) und eingebaut in HsDod (rechts, Anregungswellenlänge bei 388 nm).

Der Vergleich der Spektren von Riboflavin und Lumiflavin in wässriger Pufferlösung zeigt, dass sich die beiden Moleküle nahezu gleich verhalten (vergleiche hierzu Abbildung 4.7). Sowohl die spektrale Signatur als auch der transiente Verlauf der Signale ist bei beiden Proben sehr ähnlich. Genauso verhält es sich auch für die Ergebnisse für HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumiflavin. Dies wird besonders bei der Betrachtung der transienten Absorptionsänderungen bei ausgewählten Wellenlängen deutlich (Abbildung 4.21). Neben der nahezu identischen spektralen Charakteristik der Daten, zeigen auch der transiente Verlauf und die Intensität der Signale eine hohe Übereinstimmung. Die leicht unterschiedlichen Intensitäten der Signale bei 440 nm und 512 nm beruhen vermutlich auf den Unterschieden in den Absorptionsspektren der beiden Proben (vergleiche hierzu die Abbildungen 4.6 und 4.19).

Diskussion

Rolle der Ribitylkette

Die Ergebnisse für HsDod-gebundenes Lumiflavin zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen für HsDod-gebundenes Riboflavin. Lumiflavin besitzt im Gegensatz zu Riboflavin keine Ribitylkette. Anhand der Ergebnisse kann eine Beteiligung der Ribitylkette am Mechanismus der schnellen Entvölkerung des reaktiven elektronisch

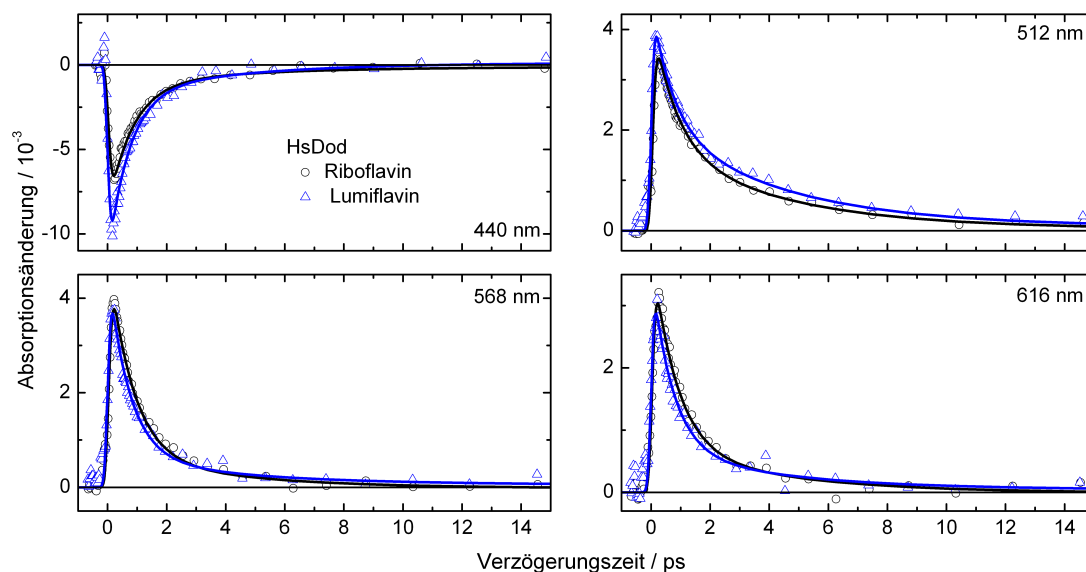


Abbildung 4.21: Transiente Absorptionsänderungen für Riboflavin und Lumiflavin eingebaut in HsDod bei ausgewählten Wellenlängen nach Photoanregung bei 388 nm. Die transienten Absorptionsänderungen wurden bezüglich der Absorption bei 388 nm normiert. Die angegebenen Absorptionsänderungen beziehen sich auf die Messung von HsDod-gebundenem Riboflavin.

angeregten Zustands, der eine schnelle Wiederbesetzung des Ausgangszustands zur Folge hat, ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit für einen Elektronentransfer von der Ribitylkette auf das photoangeregte Flavin, der an einen Protonentransfer gekoppelt ist, ist aus der Literatur hinreichend bekannt. Allerdings führt eine solche Reaktion für gewöhnlich zur Photoreduktion des Flavins mit dem Produkt Lumichrom (siehe Kapitel 3.1) [147–150]. In HsDod wird jedoch gerade der Abbau des Riboflavins verhindert und die Lebensdauer gegenüber Riboflavin in Lösung deutlich erhöht.

Rolle der leicht abweichenden Position

Wie bereits in Kapitel 4.1.1 gezeigt, bindet Lumiflavin in einer Position in der HsDod-Bindetasche, die der des Lumichroms entspricht und im Vergleich zu der Position des Riboflavins leicht verändert ist [111]. Diese sogenannte geschlossene Position kann für Riboflavin auch ermöglicht werden, indem der Aminosäurerest E45 durch Alanin ersetzt wird. Bei dieser E45A-Mutante bindet Riboflavin zwar in der höher affinen geschlossenen Position, allerdings ist insgesamt die Affinität durch das Fehlen der stabilisierenden Wechselwirkung zwischen der Ribitylkette und E45 herabgesetzt [111]. Die Ergebnisse für Lumiflavin zeigen somit auch, dass die leicht veränderte Position keine Auswirkungen auf den Mechanismus hat. Durch die unterschiedlichen Positionen der Cofaktoren in der Bindetasche wird also lediglich eine hohe Affinität zu Lumichrom, durch die optimalen Wechselwirkungen zwischen (Iso)alloxazin-Einheit und den Aminosäuren in der

Bindetasche, und Riboflavin, durch die zusätzliche stabilisierende Wechselwirkung zu E45, gewährleistet. Die Lebensdauer des angeregten Zustands und somit die Möglichkeit für unerwünschte Nebenreaktionen wird durch die leicht veränderte Position des Cofaktors nicht beeinträchtigt.

4.4.3 HsDod mit FAD

Eine Besonderheit des Dodecins gegenüber anderen RfbP ist der Einbau von zwei Riboflavinmolekülen in einer Bindetasche. In anderen Flavinbindeproteinen kann meist nur ein Flavin pro Bindetasche eingebaut werden. Daher ist es von hohem Interesse, ob der Einbau des zweiten Flavins eine Bedeutung für den Löschungsmechanismus besitzt oder lediglich der Optimierung der Flavinbeladung dient. Aus der Literatur sind Fluoreszenzselbstlöschungsprozesse bei Flavinen aufgrund von Dimerbildung bei hohen Konzentrationen bekannt. Daher ist die Möglichkeit einer Funktion des zweiten Flavins für den Löschungsmechanismus im HsDod durchaus denkbar [76–80]. Für die Untersuchung der Rolle des zweiten Flavins in der Bindetasche kann die Eigenschaft des archaealen Dodecins genutzt werden, FAD in seiner geschlossenen Konformation zu binden, wobei der Adeninrest des FADs die zweite Flavinposition in der Bindetasche besetzt [112]. Sollte das zweite Flavin in einer mit Riboflavin besetzten HsDod-Bindetasche Relevanz für den Löschungsmechanismus besitzen oder zu den Differenzsignalen beitragen, so sollten Unterschiede in den transienten Spektren von HsDod-gebundenem Riboflavin und FAD erkennbar sein.

Statische Absorptionsspektroskopie

FAD zeigt in wässriger Pufferlösung (pH 7,5) für den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang ein Absorptionsmaximum bei 448 nm und für den $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang ein Maximum bei 376 nm (Abbildung 4.22). Der Einbau von FAD führt zu der Ausbildung einer leichten Schulter in der langwelligen Flanke der $S_0 \rightarrow S_1$ -Bande, die sich vor allem in der höheren Absorption oberhalb von 500 nm im Vergleich zum freien FAD bemerkbar macht. Die Absorptionsbande bei 376 nm wird durch den Einbau in das Protein um etwa 3 nm zu längeren Wellenlängen verschoben. Dieser Unterschied zu den kleineren Flavinen könnte durch die veränderte Situation in der Bindetasche hervorgerufen werden, bei der die zweite Flavinposition von einem Adeninrest besetzt ist. Das Absorptionsmaximum bei 448 nm wird durch den Einbau in HsDod nicht verschoben.

Transiente Absorptionsspektroskopie

In Abbildung 4.23 sind die transienten Absorptionsänderungen nach Photoanregung von FAD in wässriger Pufferlösung sowie gebunden in HsDod gezeigt. Bei der Betrachtung des transienten Differenzspektrums von FAD in Pufferlösung sind deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen für Riboflavin zu beobachten (vergleiche hierzu Abbildung 4.7). Die Lebensdauer der Differenzsignale, die dem Grundzustandsbleichen, der stimulierten Emission und der Absorption des angeregten Zustands zuzuordnen sind, zeigen im Falle

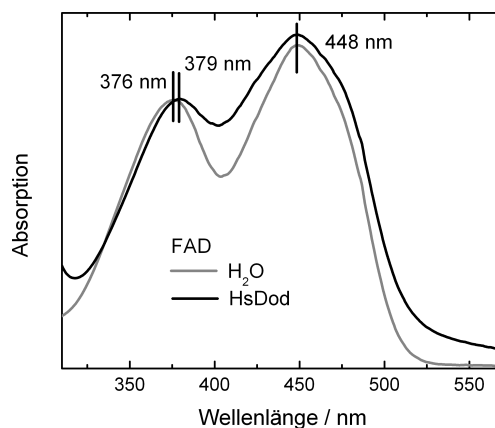


Abbildung 4.22: Statische Absorptionsspektren von FAD in Pufferlösung und gebunden in HsDod. Die Spektren wurden anhand der Absorption bei 376 nm normiert.

des FADs eine geringere Lebensdauer als die des Riboflavins. Dies liegt daran, dass FAD in Lösung in einer geschlossenen und einer offenen Konformation vorliegen kann, die miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht stehen. In der geschlossenen Form können die π -Systeme der Flavineinheit und des Adeninrestes miteinander wechselwirken. FAD zeigt bereits in den statischen Fluoreszenzspektren eine deutlich geringere Fluoreszenz als Riboflavin, da der angeregte Zustand des Flavins in der geschlossenen Form des FADs durch einen Elektronentransfer vom Adeninrest auf die Flavineinheit entvölkert wird. Dieses Phänomen wurde hinreichend untersucht [68, 82, 83, 147, 151] und ist für die Experimente an HsDod-gebundenem FAD interessant, da hier die geschlossene Form des FADs in die Bindetasche eingebaut wird. Untersuchungen der FAD-Fluoreszenz mit Hilfe der Fluoreszenzaufwärtskonvertierungstechnik ergaben eine schnelle Zeitkonstante von etwa 1 ps, die Relaxationsprozessen durch umgebende Wassermoleküle zugeordnet wurde, eine Zeitkonstante von 9 ps, die dem Elektronentransferprozess vom Adenin- auf den Flavinrest zugeordnet wurde, und eine lange Zeitkonstante von 2,6 ns die der Isomerisierungsdynamik des FADs zwischen offener und geschlossener Form zuzuschreiben ist [82]. Sollte das zweite Flavin in der mit Riboflavin besetzten HsDod-Bindetasche relevant für den Löschungsmechanismus des HsDod-gebundenen Flavins sein, so werden Unterschiede in den transienten Spektren erwartet, wenn die zweite Position von einem Adenin anstelle eines Flavins besetzt ist.

Die transienten Daten für HsDod-gebundenes FAD zeigen große Ähnlichkeit mit den Ergebnissen für Riboflavin und Lumiflavin. Lediglich im Bereich des Grundzustandbleichens reicht das negative Differenzsignal bei FAD weiter in den Bereich längerer Wellenlängen als für Riboflavin und Lumiflavin. Dies hängt vermutlich mit dem spektral leicht verschobenen Absorptionsspektrum zusammen (vergleiche hierzu Abbildungen 4.6 und 4.22). Die große Ähnlichkeit der Ergebnisse wird durch die Betrachtung der transienten Daten für HsDod-gebundenes FAD und Riboflavin bei einzelnen Wellenlängen

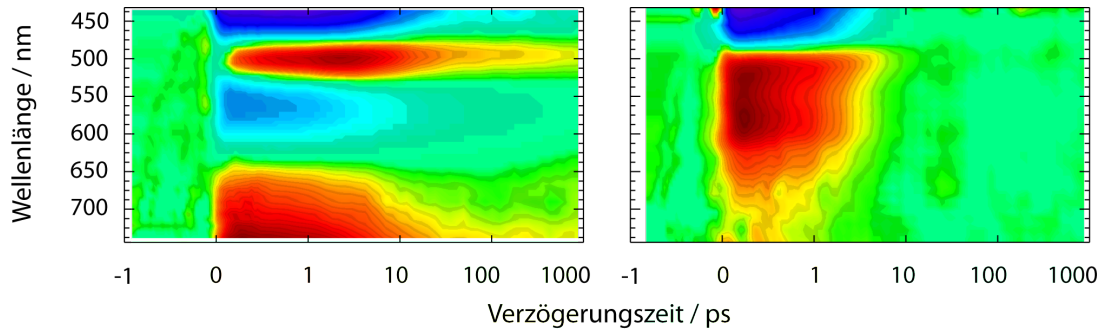


Abbildung 4.23: Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen für FAD in Pufferlösung (links, Anregungswellenlänge von 475 nm) und eingebaut in HsDod (rechts, Anregungswellenlänge von 388 nm). Wie bereits für HsDod-gebundenes Lumiflavin und Riboflavin gezeigt, weist auch HsDod gebundenes FAD keine Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge auf, weshalb der Vergleich der beiden transienten Spektren trotz unterschiedlicher Anregungswellenlänge hier legitim ist.

verdeutlicht (Abbildung 4.24).

Eine genauere Betrachtung der transienten Absorptionsänderungen bei einzelnen Wellenlängen zeigt leichte Unterschiede zwischen den Ergebnissen von FAD und Riboflavin, jeweils gebunden in HsDod. So scheinen die Differenzbanden für FAD zunächst langsamer zu zerfallen, gehen doch schließlich nahezu gleichzeitig wie die transienten Absorptionsänderungen von Riboflavin auf Null zurück.

Globale Fitanalyse

Um die kleinen Unterschiede in den transienten Daten näher zu untersuchen, wurde eine globale Fitanalyse der Daten von HsDod-gebundenem FAD im Vergleich zu HsDod-gebundenem Riboflavin durchgeführt. Die ermittelten Zeitkonstanten sind in Tabelle 4.1 gezeigt. Aus denselben Gründen wie bereits in Kapitel 4.4.1 für HsDod-gebundenes Riboflavin beschrieben, werden die kurzen Zeitkonstanten τ_1 (unterhalb der Zeitauflösung des Experiments) und die Zeitkonstanten τ_∞ (deutlich länger als die maximale Verzögerungszeit) hier nicht weiter diskutiert.

| | Riboflavin | FAD |
|--------------------|---------------|---------------|
| τ_1/ps | $<0,2$ | $<0,2$ |
| τ_2/ps | $0,8 \pm 0,2$ | $0,8 \pm 0,2$ |
| τ_3/ps | 4 ± 1 | 4 ± 1 |
| τ_∞ | ∞ | ∞ |

Tabelle 4.1: Ermittelte Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten von HsDod-gebundenem Riboflavin und FAD.

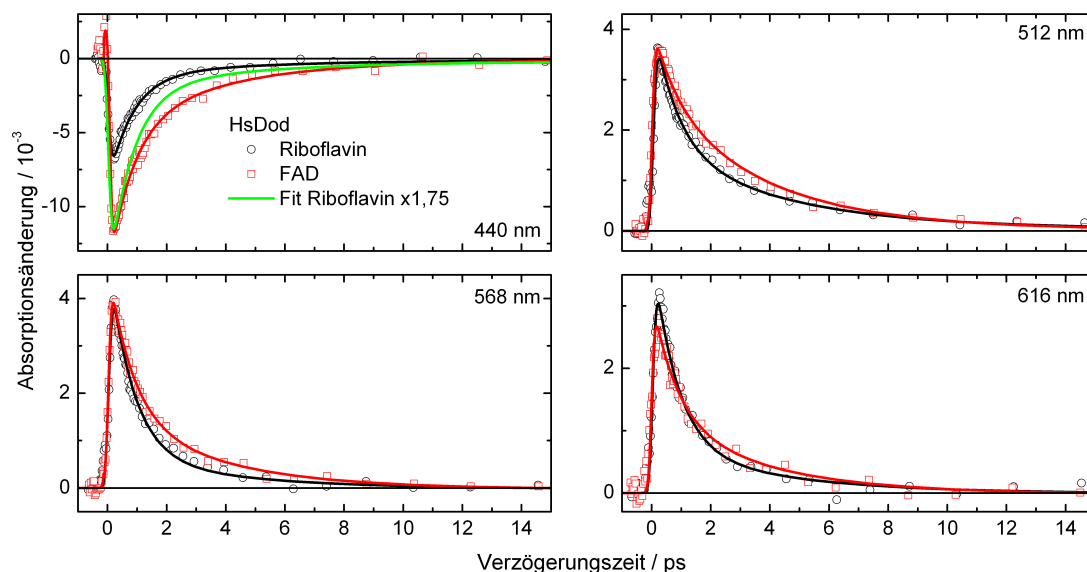


Abbildung 4.24: Transiente Absorptionsänderungen für Riboflavin und FAD eingebaut in HsDod bei ausgewählten Wellenlängen nach Photoanregung bei 388 nm. Die transienten Absorptionsänderungen wurden bezüglich der Absorption der Proben bei 388 nm normiert. Die angegebenen Absorptionsänderungen beziehen sich auf die Messung von HsDod-gebundenem Riboflavin. Zur Verdeutlichung der Dynamik im Bereich des Grundzustandsbleichens ist in grün außerdem die Fitkurve der Daten von HsDod-gebundenem Riboflavin normiert auf die Absorptionsänderung von HsDod-gebundenem FAD direkt nach der Photoanregung bei 440 nm gezeigt.

Man erkennt, dass die übrigen beiden Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 für Riboflavin und FAD gleich sind, wenn sie in HsDod eingebaut sind. Aufschluss über die spektralen Unterschiede, vor allem hinsichtlich des spektral verschobenen Grundzustandsbleichens, geben die zerfallenssoziierten Spektren (Abbildung 4.25). Die Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 zeigen unterschiedliche spektrale Signaturen. τ_2 besitzt unterhalb von etwa 500 nm eine negative Amplitude und trägt somit zur Wiederbesetzung des Ausgangszustands bei. Oberhalb von 500 nm besitzt sie eine positive Amplitude mit einem Maximum bei etwa 570 nm und beschreibt somit den Zerfall des positiven Signals in diesem Spektralbereich. Die Zeitkonstante τ_3 besitzt unterhalb von 480 nm eine negative Amplitude und trägt somit ebenfalls zur Wiederbesetzung des Ausgangszustands bei. Oberhalb von 480 nm zeigt das zerfallenssoziierte Spektrum positive Amplituden mit einem Maximum bei etwa 500 nm. Diese Zeitkonstante beschreibt also den Zerfall des langlebigeren Signals bei dieser Wellenlänge.

Während die schnelleren Zeitkonstanten τ_2 für HsDod-gebundenes FAD und Riboflavin ähnliche Amplituden aufweisen, besitzt die längere Zeitkonstante τ_3 im spektralen Bereich unterhalb von 480 nm für HsDod-gebundenes FAD deutlich stärker negative Amplituden. Grund hierfür sind spektrale Unterschiede zwischen FAD und Riboflavin, die auch schon im statischen Absorptionsspektrum zu beobachten sind (vergleiche hierzu Abbildungen

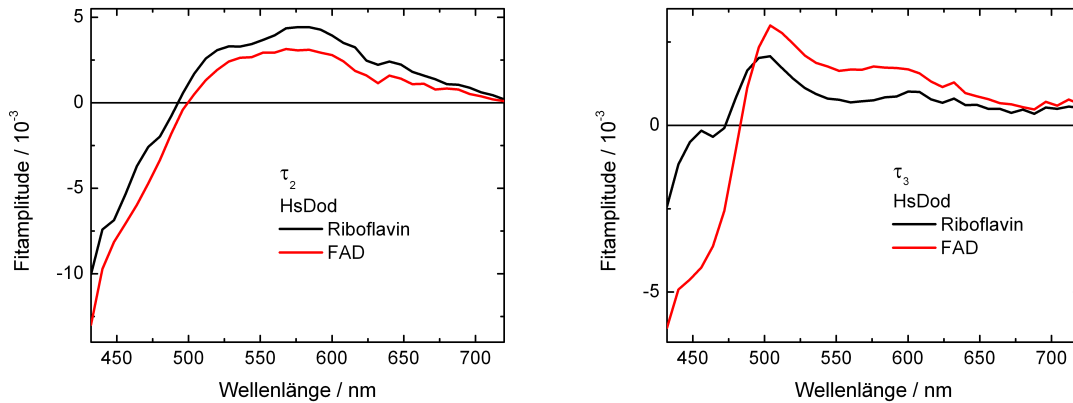


Abbildung 4.25: Zerfallsspektren der Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 aus der globalen Fitanalyse der Daten für HsDod-gebundenes Riboflavin und FAD.

4.6 und 4.22). Dies legt nahe, dass die positiven Absorptionsänderungen, die mit der Zeitkonstante τ_3 zerfallen, vom Chromophor Flavin dominiert sind, während sie für τ_2 von der Absorption einer anderen Spezies dominiert sind, die für beide Proben (HsDod-gebundenes Riboflavin und FAD) identisch ist. Die negativen Amplituden unterhalb von 480 nm beschreiben für beide Zeitkonstanten die Rückkehr des Flavins in den Ausgangszustand. Somit tragen die verschiedenen Prozesse, denen die beiden Zeitkonstanten zuzuschreiben sind, alle zur Wiederbesetzung des Ausgangszustands bei.

Diskussion

Mit Hilfe von HsDod-gebundenem FAD konnte die Rolle des zweiten Liganden in der Bindetasche für den Mechanismus der schnellen Abführung der Energie nach Photoanregung eines Flavins untersucht werden. Zwar kann auch ein Elektronentransfer vom Adeninrest auf das photoangeregte Flavin zu einer schnellen Entvölkerung des angeregten Zustands führen, allerdings erwartet man aufgrund des von Tryptophan und auch Flavin abweichenden Standardelektrodenpotentials von Adenin andere Kinetiken für die entsprechenden Prozesse wie Elektronentransfer und -rücktransfer. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der zweite Flavinrest nicht maßgeblich an der Entvölkerung des angeregten Zustands des photoangeregten Flavins beteiligt ist. Stattdessen verfolgt die Beladung einer Bindetasche mit zwei Flavinen vermutlich das Ziel der Maximierung der Flavinbeladung eines Proteins. Mit einem Riboflavinmolekül auf 68 Aminosäuren ist das Dodecinprotein tatsächlich das Flavoprotein mit der höchsten, bisher entdeckten Riboflavinbeladung [6, 102].

Die Ergebnisse der globalen Fitanalyse und die spektrale Signatur der zerfallsspektren deuten an, dass die positiven Signale, die mit der Zeitkonstante τ_3 zerfallen, vom Flavin dominiert sind. Das zerfallsspektren der Zeitkonstante τ_2 hingegen zeigt für HsDod-gebundenes Riboflavin und FAD ähnliche spektrale Signa-

turen und deutet an, dass das Differenzspektrum von einer anderen Spezies dominiert wird (z. B. Tryptophan). Die negative Amplitude im Bereich des Grundzustandsbleichens für beide Zeitkonstanten zeigt jedoch, dass der Ausgangszustand des Flavins mit beiden Zeitkonstanten wiederhergestellt wird. Bei einem reinen Elektronentransfer- und -rücktransfermechanismus würde sowohl die erwartete radikalische Tryptophanspezies als auch die Flavosemichinonspezies mit der gleichen Zeitskala gebildet werden und wieder zerfallen.

Weiterhin konnte mit Hilfe der Ergebnisse für HsDod-gebundenes FAD gezeigt werden, dass das nicht-photoangeregte Flavin in der mit zwei Flavinen besetzten Bindetasche nicht zu den Differenzsignalen beiträgt. Durch die veränderte Situation in der Bindetasche nach der Photoanregung eines Flavins könnte sich die Absorption des nicht-angeregten Flavins verschieben. Durch Austausch des zweiten Flavins durch Adenin hätte man in diesem Fall Unterschiede zwischen den Messungen für HsDod-gebundenes Riboflavin und FAD erwartet, die in den gezeigten Messungen jedoch nicht zu beobachten sind.

4.4.4 HsDod mit Riboflavin und Lumichrom

Eine weitere Möglichkeit, die Rolle des zweiten Flavins in der Bindetasche zu untersuchen, bietet die Eigenschaft von HsDod auch Lumichrom zu binden. Hierbei können die Bindetaschen zumindest teilweise mit einem Riboflavin- und einem Lumichrommolekül besetzt werden. Diese Probe ist vor allem interessant, da Lumichrom auch *in vivo* einen Cofaktor von HsDod darstellt [111]. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl homogen (Riboflavin/Riboflavin, bzw. Lumichrom/Lumichrom) als auch heterogen besetzte Bindetaschen (Lumichrom/Riboflavin) auftreten können.

Statische Absorptionsspektroskopie

In Abbildung 4.26 links sind zum einen die statischen Absorptionsspektren von Lumichrom in wässriger Pufferlösung (pH 7,5) und eingebaut in HsDod gezeigt. Man erkennt, dass die Absorptionsbanden im gezeigten spektralen Bereich kaum eine Verschiebung erfahren und lediglich die Ausbildung einer Schulter um 420 nm zu beobachten ist. Diese ist vermutlich, ähnlich wie bei Riboflavin, auf die Wechselwirkung der π -Systeme der Alloxazineinheiten und der Tryptophanreste in der Bindetasche zurückzuführen. Des Weiteren zeigt die Abbildung 4.26 rechts die statischen Absorptionsspektren von HsDod besetzt mit Riboflavin, Lumichrom und einer 1:1-Mischung aus beiden Cofaktoren. Frühere Untersuchungen zeigten, dass sich das Absorptionsspektrum der Probe, die Riboflavin und Lumichrom enthält, nicht additiv aus den Spektren der Proben mit nur Riboflavin und nur Lumichrom zusammensetzt [5]. Es wurde daraus geschlossen, dass diese Abweichung nur von den heterogen besetzten Bindetaschen herrühren kann und dass sich Lumichrom und Riboflavin hier gegenseitig beeinflussen. Über die genaue Verteilung auf homogen und heterogen besetzte Bindetaschen kann keine Auskunft gegeben werden, frühere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass es sich nicht um eine rein statistische Verteilung handelt [5].

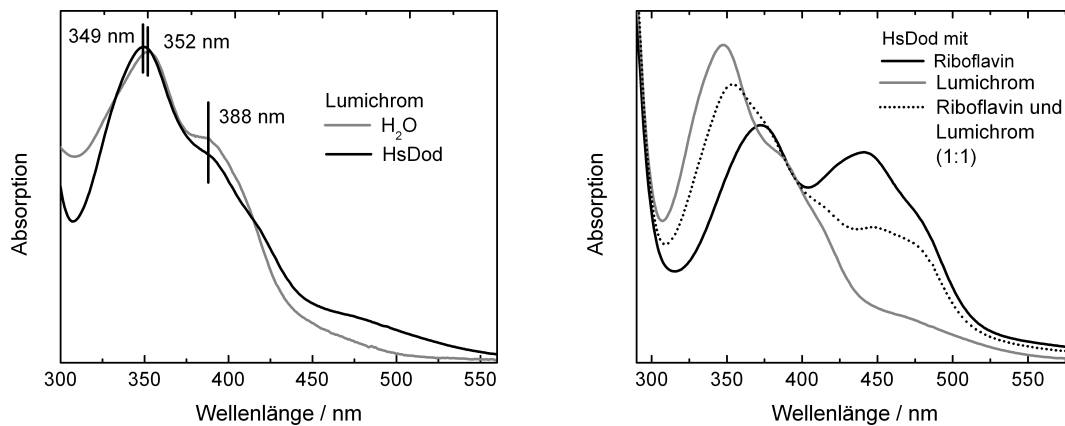


Abbildung 4.26: Links: Statische Absorptionsspektren von Lumichrom in Pufferlösung und gebunden in HsDod. Die Spektren wurden anhand der Absorption bei 352 nm normiert. Rechts: HsDod besetzt mit Riboflavin, Lumichrom und einem 1:1 Gemisch aus Riboflavin und Lumichrom. Die Spektren wurden basierend auf den Ergebnissen von M. Gringer anhand der Absorption bei 388 nm normiert, da hier alle drei Proben vergleichbare Extinktionskoeffizienten besitzen [5].

Transiente Absorptionsspektroskopie

Bei der Betrachtung von vollständig oder teilweise mit Lumichrom besetzten Bindetaschen ist zu berücksichtigen, dass das Alloxazinsystem des Lumichroms andere Absorptionseigenschaften besitzt als das Isoalloxazinsystem des Riboflavins. Daher ist bei diesen Proben die Anregungswellenlänge von großer Bedeutung. So wird z. B. bei einer Wellenlänge von 475 nm hauptsächlich Riboflavin angeregt, da Lumichrom in diesem Bereich keine Absorptionsbande besitzt und auch HsDod-gebundenes Lumichrom nur eine geringe Absorption aufweist. Bei 388 nm hingegen können beide Moleküle angeregt werden. In Abbildung 4.27 sind daher transiente Spektren von HsDod-gebundenem Riboflavin, Lumichrom und einer 1:1 Mischung aus beiden jeweils nach Anregung bei 388 nm und 475 nm gezeigt. In den Abbildungen 4.28 und 4.29 sind die transienten Absorptionsänderungen für einzelne Abtastwellenlängen nach Photoanregung bei 475 nm bzw. 388 nm für die unterschiedlichen Proben gezeigt.

Insgesamt sind die Signalamplituden bei der Anregungswellenlänge von 475 nm geringer als bei 388 nm (Abbildungen 4.28 und 4.29). Dies ist zum einen auf eine geringere Anregungsintensität, zum anderen auf die geringere Absorption der Proben bei dieser Wellenlänge, zurückzuführen. Besonders deutlich wird dies bei Lumichrom gebunden in HsDod. Die geringere Signalintensität sowie die im Vergleich zu 388 nm weniger stabilen Anregungspulse führen dazu, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 475 nm schlechter ist, als für die Messung mit 388 nm Anregung (Abbildung 4.27).

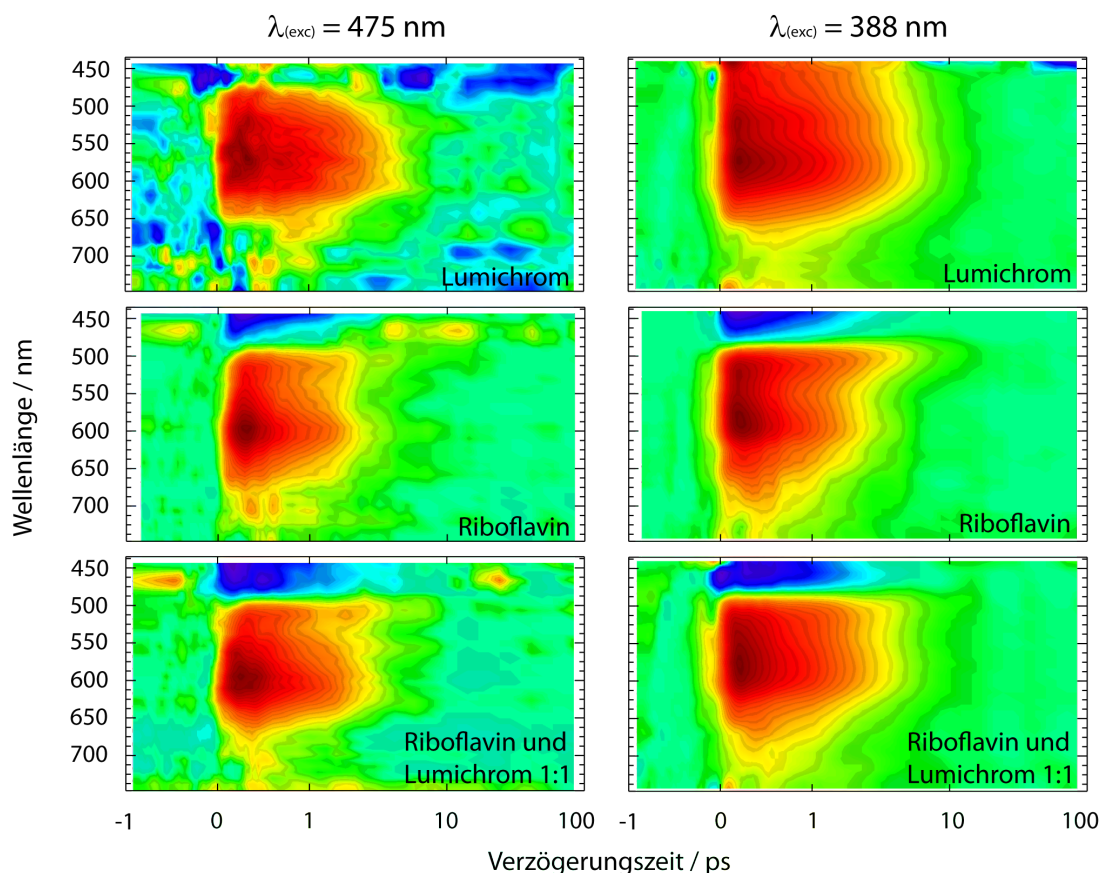


Abbildung 4.27: Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen für HsDod-gebundenes Lumichrom (oben), Riboflavin (Mitte) und eine Mischung aus Riboflavin und Lumichrom (1:1) (unten). Die Anregungswellenlängen lagen bei 475 nm (links), bzw. 388 nm (rechts).

HsDod-gebundenes Lumichrom

Die Messung von HsDod-gebundenem Lumichrom bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm zeigt trotz der geringen Absorption von Lumichrom in diesem Spektralbereich ein deutliches Differenzsignal mit einer positiven Absorptionsänderung zwischen 470 nm und 650 nm (Abbildung 4.27 links, oben). Diese zerfällt innerhalb der ersten 10 ps. Die Messung weist aufgrund der geringen Absorption der Probe bei der verwendeten Anregungswellenlänge und der daraus resultierenden niedrigen Differenzsignale ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Ein weit besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zeigt die Messung der Probe bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm (Abbildung 4.27 rechts, oben). In diesem Bereich besitzt die Probe eine weit höhere Absorption als bei 475 nm. Das positive Differenzsignal erstreckt sich über den gesamten untersuchten Spektralbereich, wobei nur eine geringe Intensität der Differenzsignale oberhalb von 650 nm beobachtet wird. Ein Maximum liegt bei etwa 575 nm. Im Rahmen des

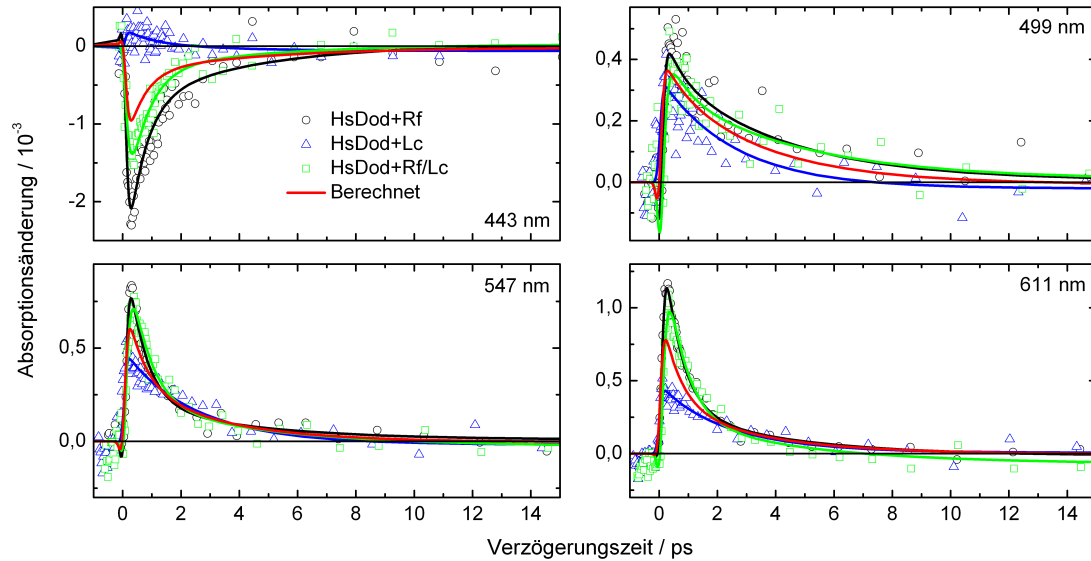


Abbildung 4.28: Transiente Absorptionsänderungen für HsDod-gebundenes Riboflavin, Lumichrom und eine 1:1-Mischung aus Lumichrom und Riboflavin für ausgewählte Wellenlängen nach Photoanregung bei 475 nm. Die angegebene Absorptionsänderung bezieht sich auf HsDod-gebundenes Riboflavin und die anderen Spektren wurden mit Hilfe der statischen Spektren normiert, so dass die Absorption bei 388 nm bei allen drei Proben gleich ist. In rot ist das gemittelte Spektrum aus den beiden Proben mit nur homogen besetzten Bindetaschen (Riboflavin oder Lumichrom) gezeigt.

Signal-zu-Rausch-Verhältnisses sind keine eindeutigen Unterschiede im transienten Verlauf der Differenzsignale für die unterschiedlichen Anregungswellenlängen auszumachen (Abbildung 4.30).

Ein Vergleich der Ergebnisse für HsDod-gebundenes Lumichrom mit Daten für Lumichrom in wässriger Lösung ist in diesem Rahmen aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von Lumichrom nicht möglich. Jedoch liegt die Fluoreszenzlebensdauer von Lumichrom in wässriger Lösung bei 2,7 ns mit einem Fluoreszenzmaximum bei 462 nm [152, 153], woraus geschlossen werden kann, dass auch die Lebensdauer des angeregten Zustands des Lumichroms deutlich verkürzt wird, wenn es in HsDod eingebaut vorliegt. Das Fehlen einer stimulierten Emission bei 462 nm gibt Anlass zu der Annahme, dass sich das angeregte Lumichrommolekül nach der Photoanregung (innerhalb der experimentellen Zeitauflösung) bereits nicht mehr im angeregten Zustand befindet. In der Literatur findet man Hinweise, dass auch die Fluoreszenz von Lumichrom durch die Anwesenheit aromatischer Elektronen-Donoren gelöscht werden kann [153]. Als Ursache wird ein Elektronentransferprozess diskutiert. In unserem Fall käme, analog zu der mit Riboflavin besetzten Bindetasche, Tryptophan als Elektronendonator in Frage.

HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom

Bei den Ergebnissen für die Probe, bei der HsDod mit einer 1:1-Mischung aus Riboflavin

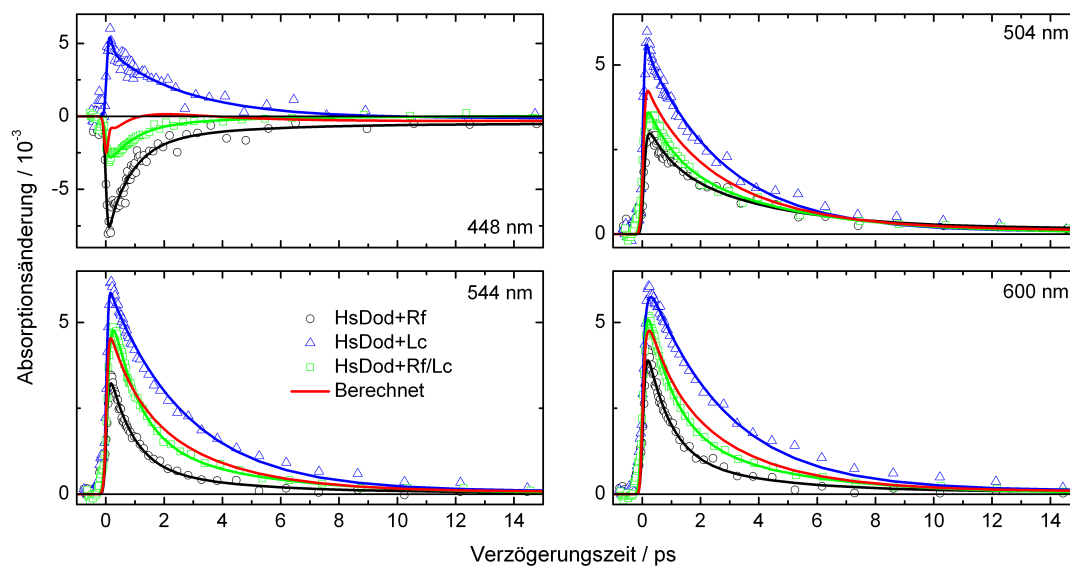


Abbildung 4.29: Transiente Absorptionsänderungen für HsDod-gebundenes Riboflavin, Lumichrom und eine 1:1-Mischung aus Lumichrom und Riboflavin nach Photoanregung bei 388 nm für ausgewählte Wellenlängen. Die angegebene Absorptionsänderung bezieht sich auf HsDod-gebundenes Riboflavin und die anderen Spektren wurden analog zu der Messung mit einer Anregungswellenlänge von 475 nm normiert. In rot ist das gemittelte Spektrum aus den beiden Proben mit nur homogen besetzten Bindetaschen (Riboflavin oder Lumichrom) gezeigt.

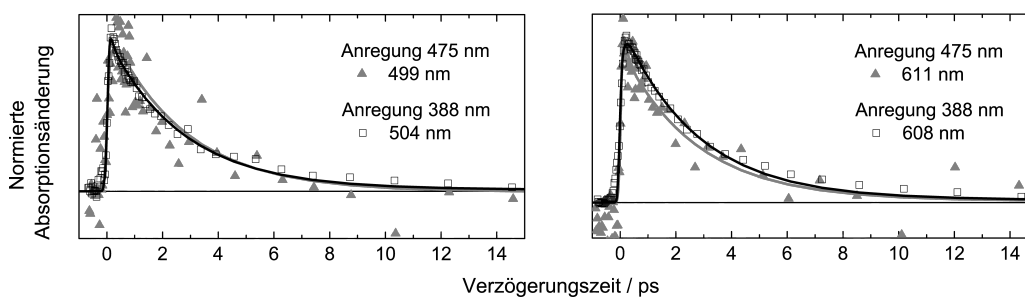


Abbildung 4.30: Transiente Absorptionsänderungen für HsDod-gebundenes Lumichrom nach Photoanregung bei 475 nm und 388 nm für ausgewählte Wellenlängen. Die Kurven wurden anhand der Absorptionsänderung direkt nach der Photoanregung normiert.

und Lumichrom besetzt wurde, erkennt man keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Messungen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen (Abbildung 4.31).

Dies ist erstaunlich, da Riboflavin und Lumichrom bei den jeweiligen Wellenlängen unterschiedliche Absorptionsstärken besitzen und so bei den Messungen Riboflavin und Lumichrom in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander angeregt werden sollten. Lediglich bei einer Abtastwellenlänge um 500 nm beobachtet man leichte Unterschiede

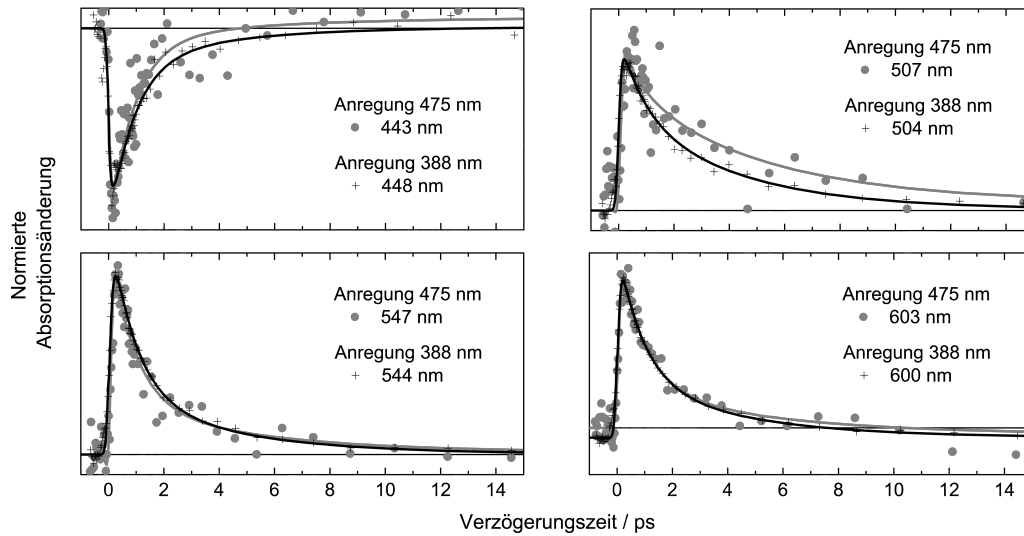


Abbildung 4.31: Transiente Absorptionsänderungen einer 1:1-Mischung aus Riboflavin und Lumichrom gebunden in HsDod nach Photoanregung bei 475 nm und 388 nm für ausgewählte Abtastwellenlängen. Die Kurven wurden anhand der Absorptionsänderung direkt nach der Photoanregung normiert.

zwischen den Messungen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse für die verschiedenen Anregungswellenlängen muss jedoch auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis berücksichtigt werden. Dieses ist für die Ergebnisse der Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 475 nm deutlich geringer als für die mit einer Anregung bei 388 nm.

Die homogen besetzten Bindetaschen sollten zu gleichen Differenzsignalen führen, wie die Proben mit jeweils nur einer Art von Cofaktor (Riboflavin oder Lumichrom). In den Abbildungen 4.28 und 4.29 sind daher neben den Absorptionsänderungen für die Proben mit Riboflavin, Lumichrom und einer 1:1-Mischung aus beiden Cofaktoren auch eine gemittelte Kurve aus den Absorptionsänderungen der beiden Proben mit jeweils nur einer Art von Cofaktor gezeigt. Die Kurven wurden hierzu so normiert, dass die Absorption bei 388 nm für alle drei Proben gleich ist. Dies ist zumindest für die Proben mit nur einer Art von Cofaktor legitim, da hier der molare Extinktionskoeffizient bei 388 nm gleich groß ist [5]. Der Extinktionskoeffizient für die Probe mit gemischten Cofaktoren liegt etwas niedriger, dies muss beim Vergleich der Spektren beachtet werden.

Die Signalintensität liegt wie erwartet sowohl für die Messungen mit 475 nm als auch mit 388 nm Anregungswellenlänge im gesamten untersuchten Spektralbereich zwischen den Signalen für die Proben mit ausschließlich lumichrom- oder riboflavinbesetzten Bindetaschen. Bei der Messung mit einer Anregungswellenlänge von 475 nm ist der transiente Verlauf der Absorptionsänderungen im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses vergleichbar mit dem Mittel aus den Proben mit jeweils nur einer Art von Cofaktor. Intensitätsunterschiede können unter anderem auf leichte Variationen in den experimentellen

Bedingungen oder die Normierung zurückgeführt werden.

Auch bei dem Experiment mit 388 nm Anregungswellenlänge sind nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Absorptionsänderungen für Lumichrom und Riboflavin (1:1) gebunden an HsDod und der gemittelten Kurve aus den beiden Proben mit nur einer Art von Cofaktor zu erkennen. Bei dieser Anregungswellenlänge ist der Extinktionskoeffizient von Riboflavin und Lumichrom in etwa gleich hoch [5]. Auffällig ist, dass die Absorptionsänderungen bei 504 nm, 544 nm und 600 nm zwar mit den gemittelten Kurven in Bezug auf die Intensität vergleichbar sind, jedoch der transiente Verlauf leichte Unterschiede aufweist. Auf kurzen Zeitskalen ist ein deutlich schnellerer Abfall des Signals der gemischten Probe zu beobachten, während sich auf längeren Zeitskalen (ab etwa 5 ps) die beiden Kurven wieder einander annähern. Im Bereich um 448 nm dominiert das Grundzustandsbleichen des Riboflavins, jedoch sorgt der Beitrag der positiven Absorptionsänderung des Lumichroms für eine niedrigere Amplitude.

Die Auswertung der Probe mit zwei unterschiedlichen Cofaktoren ist nicht einfach durchzuführen, da hier drei unterschiedlich besetzte Bindetaschen zu berücksichtigen sind. Neben heterogen besetzten Bindetaschen mit einem Riboflavin- und einem Lumichrommolekül können auch homogen besetzte Bindetaschen auftreten, mit jeweils zwei Riboflavin- oder zwei Lumichrommolekülen. Zudem kann in den heterogen besetzten Bindetaschen entweder das Lumichrom- oder das Riboflavinmolekül angeregt werden. Insgesamt können also vier unterschiedliche Zustände direkt nach Photoanregung vorliegen (Lc/Lc^* , Rf/Rf^* , Lc/Rf^* und Rf/Lc^*). Das Verhältnis zwischen homogen und heterogen besetzten Bindetaschen ist nicht genau bekannt.

Globale Fitanalyse

Zur weiteren Auswertung wurden die transienten Daten einer globalen Fitanalyse unterzogen. Die Daten für HsDod-gebundenes Riboflavin konnten, wie bereits in vorangegangenen Abschnitten gezeigt, für beide Anregungswellenlängen erfolgreich mit vier Zeitkonstanten beschrieben werden. Für die Beschreibung der transienten Daten von HsDod-gebundenem Lumichrom waren sowohl für 475 nm als auch für 388 nm Anregungswellenlänge drei Zeitkonstanten notwendig. Für die transienten Daten der Probe mit beiden Cofaktoren im Verhältnis 1:1 waren für beide Anregungswellenlängen vier Zeitkonstanten notwendig. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

Für alle Datensätze erhielt man eine kurze Zeitkonstante τ_1 unterhalb der Zeitauflösung des Experiments und eine τ_∞ , deutlich länger als die maximale Verzögerungszeit und mit vernachlässigbarer Amplitude. Diese beiden Zeitkonstanten werden hier nicht näher betrachtet.

Die Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 für HsDod-gebundenes Riboflavin und ihre zerfallassozierten Spektren wurden bereits in Kapitel 4.4.1 beschrieben. Für HsDod-gebundenes Lumichrom erhält man für die Anregungswellenlängen von 475 nm und 388 nm neben den Zeitkonstanten τ_1 und τ_∞ eine weitere Zeitkonstante τ_3 . Die zerfallassozierten Spektren zeigen Maxima um 575 nm (Abbildung 4.32 oben). Die Amplitude ist bei der Messung mit einer Anregung von 475 nm deutlich kleiner aufgrund der geringeren Absorption

| 475 nm Anregung | | | |
|--------------------|------------------|-----------|--------------------------|
| | HsDod-gebundenes | | |
| | Riboflavin | Lumichrom | Riboflavin:Lumichrom 1:1 |
| τ_1/ps | <0,15 | <0,15 | <0,15 |
| τ_2/ps | $0,6 \pm 0,2$ | 3 ± 1 | $0,7 \pm 0,2$ |
| τ_3/ps | 4 ± 1 | | 4 ± 1 |
| τ_∞ | ∞ | ∞ | ∞ |

| 388 nm Anregung | | | |
|--------------------|------------------|-----------|--------------------------|
| | HsDod-gebundenes | | |
| | Riboflavin | Lumichrom | Riboflavin:Lumichrom 1:1 |
| τ_1/ps | <0,15 | <0,15 | <0,15 |
| τ_2/ps | $0,8 \pm 0,2$ | 3 ± 1 | $0,9 \pm 0,2$ |
| τ_3/ps | 4 ± 1 | | 4 ± 1 |
| τ_∞ | ∞ | ∞ | ∞ |

Tabelle 4.2: Ermittelte Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten von HsDod-gebundenem Riboflavin, Lumiflavin und einer 1:1 Mischung beider Cofaktoren nach Photoanregung bei 475 nm, bzw. 338 nm.

der Probe in diesem Spektralbereich und weist aus diesem Grund auch ein schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, als die Messung bei einer Anregungswellenlänge von 388 nm. Unterhalb von 500 nm unterscheiden sich die spektralen Signaturen der zerfallassozierten Spektren für beide Anregungswellenlängen, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dies mit dem teilweise schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis zusammenhängt.

Für HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom im Verhältnis 1:1 ergeben sich für eine Anregungswellenlänge von 475 nm aus der globalen Fitanalyse neben den beiden Zeitkonstanten τ_1 und τ_∞ noch zwei weitere Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 , die gute Übereinstimmung mit den Zeitkonstanten für HsDod-gebundenes Riboflavin aufweisen. Die zerfallassozierten Spektren zeigen ebenfalls gute Übereinstimmung (Abbildung 4.32 links, Mitte und unten). Das zerfallassozierte Spektrum der Zeitkonstante τ_3 setzt sich möglicherweise aus Anteilen der τ_2 -Zeitkonstante für die HsDod-Probe mit ausschließlich Lumichrom und der τ_3 -Zeitkonstante für die Probe mit HsDod-gebundenem Riboflavin zusammen. Eine genaue Aussage ist jedoch aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und der geringen Amplituden nur schwer möglich. Auch für die Daten für HsDod mit beiden Cofaktoren und einer Anregungswellenlänge von 388 nm konnten neben den beiden Zeitkonstanten τ_1 und τ_∞ zwei weitere Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 ermittelt werden, die mit den Zeitkonstanten für HsDod-gebundenes Riboflavin vergleichbar sind. Auch die zerfallassozierten Spektren weisen spektrale Ähnlichkeiten

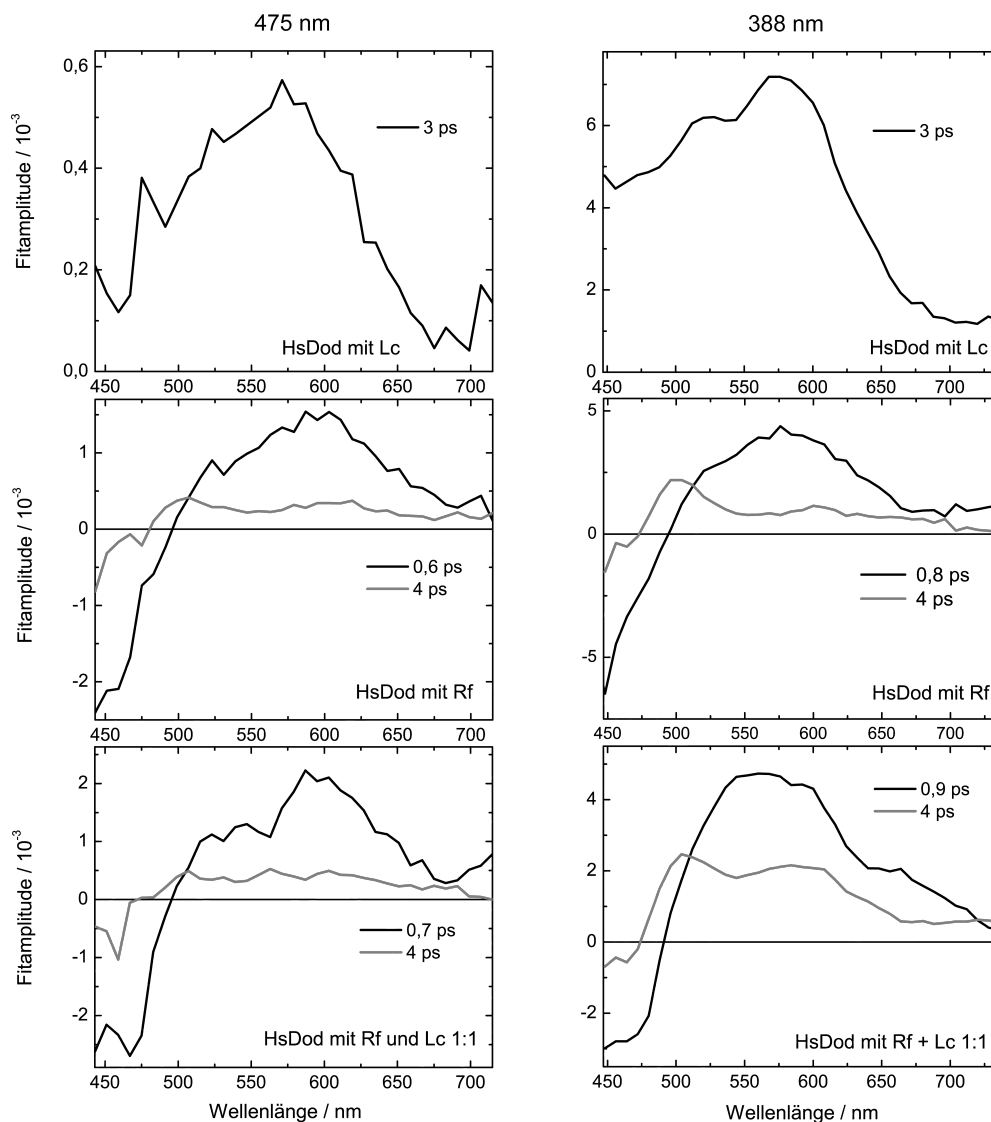


Abbildung 4.32: Zerfallsspektren der globalen Fitanalysen an den Daten von HsDod-gebundenem Lumichrom (oben), Riboflavin (Mitte) und einer Mischung aus Riboflavin und Lumichrom im Verhältnis 1:1 (unten). Die Proben wurden jeweils bei 475 nm (links) und 388 nm (rechts) angeregt. Die gezeigten Amplituden entsprechen den in den Abbildungen 4.28 und 4.29 gezeigten Absorptionsänderungen.

zu denen der Messung an HsDod-gebundenem Riboflavin auf (Abbildung 4.32 rechts, Mitte und unten). Die im Vergleich zu HsDod-gebundenem Riboflavin (Abbildung 4.32 rechts, Mitte) oder HsDod mit beiden Cofaktoren und einer Anregungswellenlänge von 475 nm (Abbildung 4.32 links, unten) weniger ausgeprägte Amplitude der Zeitkonstante τ_2 resultiert vermutlich daraus, dass bei 388 nm ein deutlicher Anteil an Lumichrom

angeregt wird. Das zerfallassozierte Spektrum der τ_3 -Zeitkonstante zeigt im Gegensatz zu HsDod-gebundenem Riboflavin ein Maximum bei etwa 600 nm und weist darauf hin, dass diese Zeitkonstante die Zeitkonstante τ_3 für HsDod-gebundenes Riboflavin und τ_2 für HsDod-gebundenes Lumichrom vereint.

Diskussion

Die Messungen an HsDod-gebundenem Lumichrom zeigen eine schnelle Rückkehr des photoangeregten Lumichroms in den anfänglichen Grundzustand. Entsprechend der geringen Absorption von Lumichrom im spektralen Bereich oberhalb von etwa 450 nm, besitzen die Ergebnisse für die Messung bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm eine deutlich geringere Amplitude als für die Messungen bei 388 nm Anregungswellenlänge. Analog zu HsDod-gebundenem Riboflavin kann ein Elektronentransfermechanismus von einem Tryptophanrest in der Bindetasche auf das photoangeregte Lumichrom angenommen werden. Die Triebkraft ΔG^0 kann aus der Differenz zwischen dem S_0 - und S_1 -Zustand des Lumichroms (2,92 eV) [152], des elektrischen Potentials der beteiligten Redoxpaare (Lumichrom/Lumichrom $^{\bullet-} \approx -0,4$ V [152] und Tryptophan/Tryptophan $^{\bullet+} \approx 1,15$ V [132] gegen eine Normalwasserstoffelektrode) berechnet werden und beträgt -1,4 eV. Der Abstand zwischen Donor (Tryptophan) und Akzeptor (Lumichrom*) beträgt hier ebenfalls 3,4 Å. Für die Berechnung der optimalen Elektronentransferrate ($\lambda = -\Delta G^0$) ergibt sich nach Gleichung 4.3 analog zu dem Ergebnis für die Riboflavin besetzte Bindetasche des Dodecins eine Zeitkonstante von 100 fs für den Elektronentransfer vom Tryptophan auf das photoangeregte Lumichrom. Für eine beispielhaft angenommene Reorganisationsenergie λ von 0,7 eV ergibt sich eine Zeitkonstante von etwa 11 ps. Die Daten zeigen jedoch, dass die Entvölkerung des ersten angeregten Zustands sehr viel schneller, bereits in weniger als 200 fs abgeschlossen ist. Dies kann aus der fehlenden stimulierten Emission geschlossen werden und legt nahe, dass entweder die Reorganisationsenergie deutlich von dem angenommenen Wert (0,7 eV) abweicht oder dass durch die räumliche Nähe der Moleküle in der aromatischen Tetrade Ladungstransferprozesse deutlich schneller ablaufen könnten. Im oben beschriebenen Fall wäre $-\Delta G^0$ größer als die Reorganisationsenergie und man würde sich im invertierten Marcus-Bereich befinden. Auch der Elektronenrücktransfer würde aufgrund der hohen negativen freien Reaktionsenthalpie ΔG^0 von -1,5 eV für den invertierten Marcus-Bereich sprechen.

Bei einem Elektronentransfer von einem Tryptophanrest in der Bindetasche auf das photoangeregte Lumichrom würde ein anionisches Lumichromradikal, dessen Absorption im Bereich von 350 nm und 480 nm erwartet wird [154], sowie ein kationisches Tryptophanradikal mit einer Absorptionsbande um 560 nm [137, 138] entstehen. Die zerfallassozierten Spektren der Messungen an HsDod-gebundenem Lumichrom zeigen in diesen spektralen Bereichen positive Amplituden, was darauf hindeutet, dass diese Spezies mit der entsprechenden Zeitkonstante zerfallen. Eine exakte Zuordnung ist jedoch schwierig, da sich die Banden hier überlagern. Auffällig ist, dass der Zerfall der Signale für HsDod-gebundenes Lumichrom im betrachteten Spektralbereich mit nur einer dominanten Zeitkonstante τ_2 von etwa 3 ps beschrieben werden kann, während für

Riboflavin eine weitere Zeitkonstante benötigt wird. Dies zeigt entweder, dass es für HsDod-gebundenes Lumichrom nur einen Reaktionskanal gibt, oder dass die Produkte eines anderen Mechanismus im betrachteten Spektralbereich keine Absorptionsbanden besitzen. In diesem Zusammenhang könnte eine Betrachtung des Grundzustandsbleichens weitere Informationen liefern. Hierfür wären Messungen mit Abtastlicht notwendig, das weiter in den UV-Bereich hinein reicht. Messungen mit CaF₂-Weißlicht könnten dazu beitragen HsDod-gebundenes Lumichrom näher zu untersuchen.

Die spektrale Ähnlichkeit zwischen 500 nm und 700 nm in den zerfallassozierten Spektren für τ_2 für HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom ist ein Hinweis darauf, dass diese Zeitkonstante für beide Proben den Zerfall einer ähnlichen Spezies beschreibt. Entsprechend wäre dieser Prozess für Lumichrom erheblich langsamer als für Riboflavin. Die spektrale Signatur könnte einem kationischen Tryptophanradikal zugeordnet werden, dass mit τ_2 aufgrund einer Elektronenrücktransfers wieder reduziert wird. Entsprechend könnten die Daten darauf hinweisen, dass der Elektronenrücktransfer im Falle des HsDod-gebundenen Lumichroms langsamer abläuft, als für Riboflavin. Dies entspricht nicht den Erwartungen. Im invertierten Markus-Bereichs sollte der Elektronenrücktransfer für Lumichrom aufgrund der geringeren Triebkraft für die Reaktion eigentlich schneller ablaufen.

Mit den spektroskopischen Untersuchungen an einer 1:1-Mischung aus Riboflavin und Lumichrom sollte untersucht werden, ob sich die beiden Cofaktoren in der Bindetasche gegenseitig beeinflussen. Dabei sind vier unterschiedliche Fälle zu beachten: Homogen besetzte Bindetaschen mit zwei Riboflavin- oder zwei Lumichrommolekülen, wobei jeweils eines photoangeregt wird und heterogen besetzte Bindetaschen mit einem Riboflavin- und einem Lumichrommolekül, wobei jeweils Riboflavin oder Lumichrom angeregt werden kann. Durch unterschiedliche Anregungswellenlängen sollten Lumichrom und Riboflavin jeweils in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander angeregt werden. Erstaunlicherweise zeigte die Dynamik aber wenig Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Dies ist insofern bemerkenswert, da zumindest von den homogen besetzten Bindetaschen in der Probe mit Riboflavin und Lumichrom das selbe Verhalten wie für die Proben mit nur einer Art von Cofaktor erwartet wird. Die Dynamik für HsDod-gebundenes Riboflavin und Lumichrom unterscheiden sich, was sich beispielsweise in den unterschiedlichen Zeitkonstanten für diese Proben zeigt. Somit sollten sich durch die unterschiedlichen Anteile von photoangeregtem Lumichrom für die beiden Anregungswellenlängen die Ergebnisse für die Probe mit beiden Cofaktoren unterscheiden. Dies konnte jedoch nicht eindeutig beobachtet werden. Die heterogen besetzten Bindetaschen könnten durchaus zu ähnlichen Ergebnissen für beide Anregungswellenlängen führen, da ein strahlungsloser Energieübertrag vom Lumichrom auf das Riboflavin innerhalb der Zeitauflösung denkbar wäre und die beobachteten Differenzsignale somit unabhängig davon sind, welcher der beiden Cofaktoren angeregt wird. Die Grundvoraussetzungen für einen strahlungslosen Energieübertrag vom photoangeregten Lumichrom auf Riboflavin nach dem Prinzip eines Förster-Resonanzenergietransfers sind erfüllt: Der Donor Lumichrom und der Akzeptor Riboflavin befinden sich in der Bindetasche in räumlicher Nähe zueinander und das Emissionsspektrum des Lumichroms überlappt mit dem Absorptionsspektrum

des Riboflavins. Für einen Förster-Resonanzenergietransfer müssen noch die elektronischen Übergangsdipolmomente möglichst parallel ausgerichtet sein [155]. Aufgrund des ungünstigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bei den Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 475 nm und der vielen zu berücksichtigenden Parameter, wie z. B. die exakte Zusammensetzung der Bindetaschen in der Probe mit beiden Liganden, sind eindeutige Aussagen über die Prozesse in der heterogen besetzten Bindetasche hier nicht möglich.

4.4.5 HsDod: D41-Mutanten

Neben Elektronentransferprozessen spielen häufig auch Protonentransferprozesse eine bedeutende Rolle für die Entvölkerung angeregter Zustände. In der BLUF-Domäne findet beispielsweise ein Elektronentransfer gefolgt von einem Protonentransfer im Photozyklus statt [98, 99, 101, 109, 156]. Daher ist es von hohem Interesse, potentielle Protonendonoren, wie einige Aminosäuren oder Lösungsmittelmoleküle, hinsichtlich ihres Einflusses auf den Lösungsmechanismus des photoangeregten Flavins in der Bindetasche von HsDod zu untersuchen.

Wie bereits in Kapitel 4.1.1 gezeigt, befindet sich unterhalb der Flavinbindetasche ein mit Wasser koordiniertes Magnesiumion. Durch dessen Anwesenheit wird zum einen die Position eines Wassermoleküls so fixiert, dass es eine Wasserstoffbrücke zum N5 des Isoalloxazinsystems ausbilden kann, zum anderen kann die Protonendonoreigenschaft des Magnesiumions beeinflusst werden. Die positive Ladung des zentralen Magnesiumions wirkt elektronenziehend und dadurch kann das koordinierte Wassermolekül leichter ein Proton abgeben. Im angeregten Zustand finden Protonentransferprozesse bevorzugt zur N5-Position des Flavins statt, während im Grundzustand eher die N1-Position als Protonenakzeptor in Frage kommt [157].

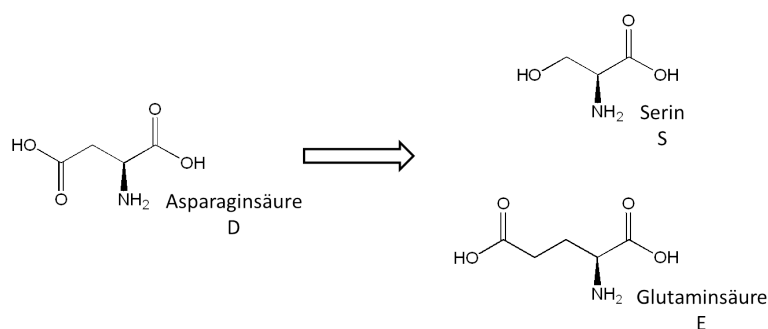


Abbildung 4.33: Strukturen der für die D41S- und D41E-Mutanten relevanten L-Aminosäuren.

An der Bindung des Magnesiumions unterhalb der Bindetasche ist der Aminosäurerest Asparaginsäure (D41) beteiligt. Durch den Austausch von Asparaginsäure an der D41-Position gegen Serin (D41S-Mutante) durch gezielte Mutation (Abbildung 4.33) im archaealen Dodecin wird die Bindung des Magnesiumions unterhalb der Bindetasche

verhindert. Dies wurde durch die Röntgenstrukturanalyse der entsprechenden Mutante bestätigt. Mit Hilfe der D41S-Mutante kann so die Rolle des wasserkoordinierten Magnesiumions für den Mechanismus, der zur schnellen Wiederbesetzung des Ausgangszustands führt, untersucht werden. Vor allem im Hinblick auf einen möglichen Protonentransfer könnte dem wasserkoordinierten Magnesiumion eine Bedeutung zukommen. Im Folgenden sind auch die Ergebnisse für eine D41E-Mutante gezeigt (Abbildung 4.33). Diese Mutante wurde zunächst zu einem anderen Zweck generiert, es zeigte sich jedoch, dass auch bei dieser Mutante an der Position unterhalb der Bindetasche kein Magnesiumion gebunden wird. Zwar besitzt Glutaminsäure (E) ebenso wie Asparaginsäure (D) am Ende ihrer Seitenkette eine Carbonsäure-Funktion, durch die etwas längere Seitenkette der Glutaminsäure und das damit verbundene knappere Platzangebot wird jedoch ein Einbau des wasserkoordinierten Magnesiumions unterhalb der Bindetasche verhindert.

Statische Absorptionsspektroskopie

Abbildung 4.34 zeigt die statischen Absorptionsspektren von Riboflavin eingebaut in den mutierten HsDod-Proteinen D41E und D41S im Vergleich zum Wildtyp-HsDod. Man erkennt, dass sowohl die Lage der Maxima und der Schulter spektral kaum verschoben sind als auch die Höhe der Absorption in etwa gleich bleibt. Somit hat das Vorhandensein des Magnesiumions keinen signifikanten Einfluss auf das statische Absorptionsspektrum. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die N5-Position des Isoalloxazinsystems im Falle der mutierten Proben nicht an einer Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül beteiligt sein kann, da sich unterhalb der Bindetasche weiterhin Wassermoleküle befinden, wenn diese auch nicht mehr durch Koordination an ein Magnesiumion so stark fixiert sind.

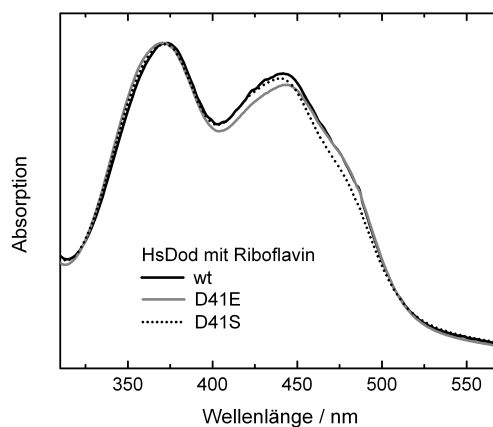


Abbildung 4.34: Absorptionsspektrum von Riboflavin eingebaut in HsDod (Wildtyp, wt), sowie in den Mutanten D41E und D41S. Die Spektren wurden anhand der Absorption bei 373 nm normiert.

Transiente Absorptionsspektroskopie

In Abbildung 4.35 sind die transienten Absorptionsänderungen von Riboflavin gebunden in den D41S- und D41E-Mutanten von HsDod im Vergleich zu Wildtyp-HsDod nach Photoanregung für einzelne ausgewählte Wellenlängen dargestellt. Im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses des Experiments sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die mutierten Proteine und denen für das Wildtyp-HsDod-Protein auszumachen. Sowohl im Bereich des Grundzustandsbleichens um 472 nm als auch im gesamten Bereich der positiven Differenzsignale zeigen die Messungen an allen drei Proben vergleichbare Intensitäten und transiente Verläufe der Differenzsignale.

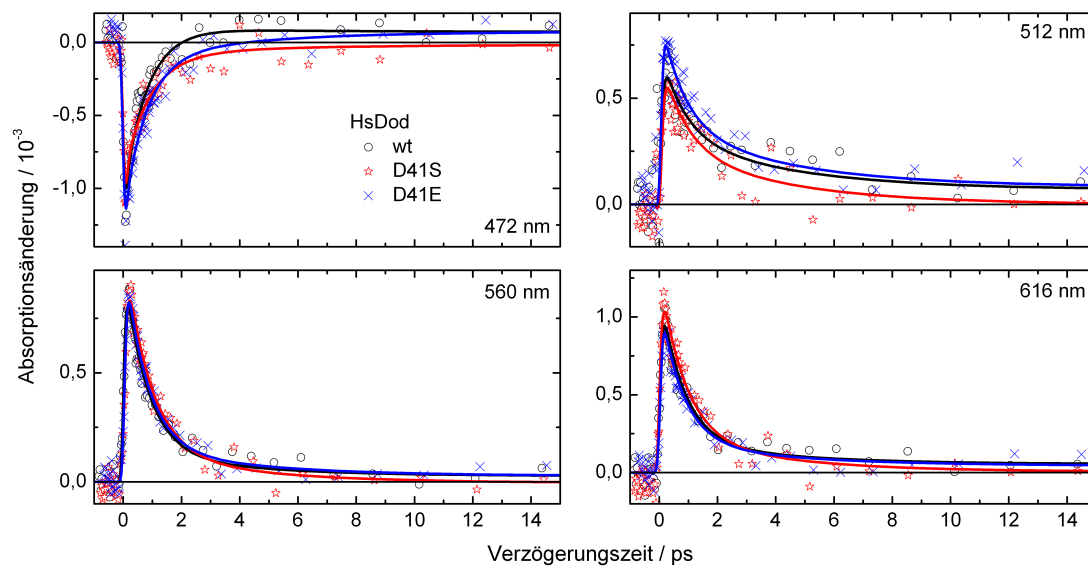


Abbildung 4.35: Transiente Absorptionsänderungen von Riboflavin eingebaut in Wildtyp-HsDod sowie jeweils in D41S und D41E Mutanten des HsDod-Proteins bei ausgewählten Wellenlängen nach einer Photoanregung bei 440 nm. Die angegebene Absorptionsänderung bezieht sich auf die Ergebnisse für Wildtyp-HsDod und die Absorptionsänderungen der Mutanten wurden anhand der Absorption der jeweiligen Probe bei 388 nm entsprechend normiert.

Diskussion

Die Ergebnisse für Riboflavin gebunden in den untersuchten D41E- und D41S-HsDod-Mutanten zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den Resultaten für den Wildtyp. Somit scheidet eine maßgebliche Beteiligung des wasserkoordinierten Magnesiumions unterhalb der Bindetasche an dem Lösungsmechanismus des photoangeregten Flavins aus. Das Magnesiumion ist an der Fixierung von Wassermolekülen beteiligt, so dass diese Wasserstoffbrücken zur N5-Position des Flavins ausbilden können, und kann die Acidität der koordinierten Wassermoleküle erhöhen, indem es durch induktive Effekte die Elektronendichte in der Bindung zwischen Wasserstoff und Sauerstoff verringert. Die

Koordination des Magnesiumions an Asparaginsäure kann diesem Effekt jedoch teilweise entgegenwirken [158]. Dennoch sind magnesiumkoordinierte Wassermoleküle, selbst bei Koordination des Magnesiumions an eine Carbonylgruppe, bessere Protonendonoren als unkoordinierte. Die Ergebnisse der transienten Spektroskopie an den D41E- und D41S-Mutanten bedeutet jedoch nicht, dass Wassermoleküle insgesamt als potentielle Protonendonoren beim Lösungsprozess der Riboflavinfluoreszenz ausscheiden, da sich auch in den mutierten HsDod-Proben weiterhin Wassermoleküle unterhalb der Bindetasche befinden [159].

4.4.6 HsDod mit Riboflavin in D₂O-Pufferlösung

Es konnte zwar gezeigt werden, dass das wasserkoordinierte Magnesiumion keinen Einfluss auf den Lösungsmechanismus besitzt, jedoch kann ein möglicher Protonentransfer von einem Wassermolekül auf das Flavin nicht ausgeschlossen werden. Zur weiteren Untersuchung wurde daher deuteriertes Lösungsmittel eingesetzt. Durch das im Vergleich zum Wasserstoff doppelt so schwere Deuterium sollte ein möglicher Protonentransferprozess verlangsamt werden. Die Verdopplung der Masse sollte die Zeitkonstante um den Faktor $\sqrt{2}$ verlängern. Mit Hilfe von HsDod in deuterierter Pufferlösung kann somit die Beteiligung eines Protonentransfers an dem Mechanismus überprüft werden.

Statische Absorptionsspektroskopie

In Abbildung 4.36 ist das statische Absorptionsspektrum von HsDod-gebundenem Riboflavin in H₂O- und D₂O-Puffer gezeigt. Die Absorptionsbande des S₀→S₂-Übergangs um 373 nm zeigt eine deutliche Blauverschiebung durch den Austausch von H₂O durch D₂O sowie eine spektrale Verbreiterung. Obwohl dieser Austausch eine Verschiebung von pH 7,5 zu pD 7,9 zur Folge hat [160] wird nicht davon ausgegangen, dass sich die Protonierung des Flavins durch diese leichte pH-Verschiebung geändert hat. In der Literatur findet man, dass eine pH-abhängige Veränderung des Absorptionsspektrums erst oberhalb von pH 9,75 und unterhalb von pH 0,4 stattfindet [161]. In Lösung zeigt Riboflavin keine Verschiebung der Banden, wenn H₂O gegen D₂O ausgetauscht wird (Abbildung 4.36, links). Bei HsDod-gebundenem Riboflavin zeigt die Lage der Absorptionsbande des S₀→S₁-Übergangs um 445 nm inklusive der Schulter um 480 nm keine Verschiebung durch den Austausch des Lösungsmittels. Allerdings ändern sich die Verhältnisse der Absorption des S₀→S₁- und des S₀→S₂-Übergangs.

Transiente Absorptionsspektroskopie

In Abbildung 4.37 ist ein Überblick über die transienten Absorptionsänderungen von HsDod-gebundenem Riboflavin in H₂O- und D₂O-Pufferlösung gezeigt. Man erkennt, dass sich die Lebensdauer des negativen Signals des Grundzustandsbleichens sowie des positiven Differenzsignals oberhalb von etwa 550 nm in deuteriertem Lösungsmittel verlängern, während die Lebensdauer des Signals um 500 nm in etwa gleich bleibt. Noch

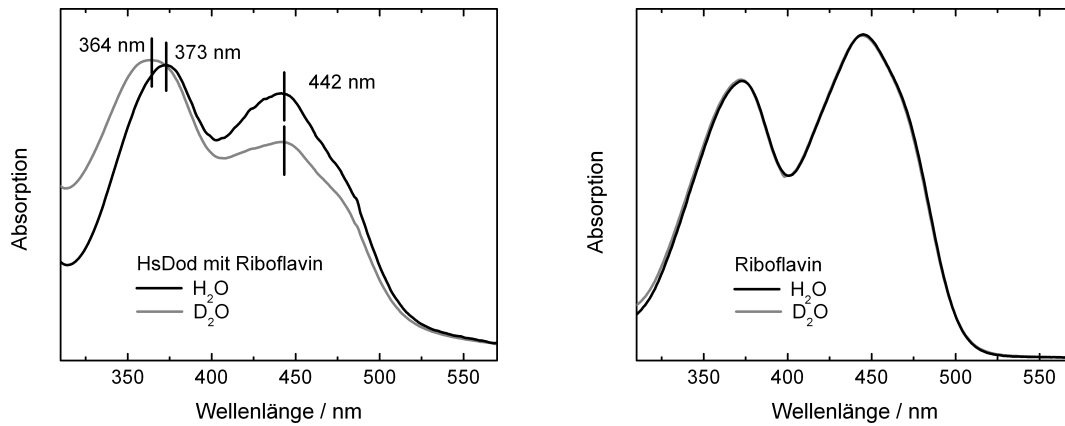


Abbildung 4.36: Links: Statisches Absorptionsspektrum von HsDod-gebundenem Riboflavin in H_2O und D_2O zwischen 310 nm und 570 nm. Rechts: Statisches Absorptionsspektrum von Riboflavin in H_2O und D_2O . Die Spektren wurden jeweils anhand der Absorption bei 373 nm normiert.

deutlicher erkennt man dies beim Vergleich der transienten Absorptionsänderung einzelner Abtastwellenlängen (Abbildung 4.38). Während die Lebensdauer des Differenzsignals bei 496 nm keine Abhängigkeit von der Deuterierung des Lösungsmittels aufweist, zeigen die transienten Absorptionsänderung im übrigen untersuchten Spektralbereich, gezeigt am Grundzustandsbleichen bei 464 nm und den positiven Absorptionsänderungen bei 560 nm und 616 nm, eine deutliche Verlängerung der Lebensdauer.

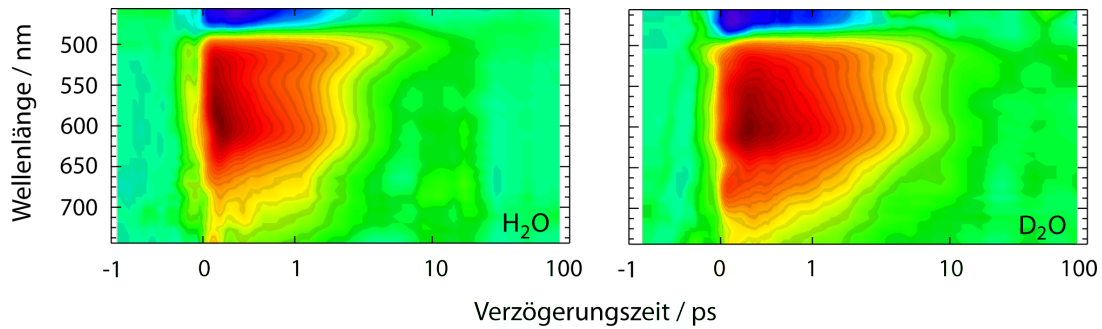


Abbildung 4.37: Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen von HsDod-gebundenem Riboflavin in H_2O - (pH 7,5) und D_2O -Puffer (pD 7,9) nach Photoanregung bei 388 nm.

Globale Fitanalyse

Um die oben genannten Beobachtungen näher zu quantifizieren, wurde eine globale Fitanalyse an den Daten von HsDod-gebundenem Riboflavin in H_2O - und D_2O -Pufferlösung

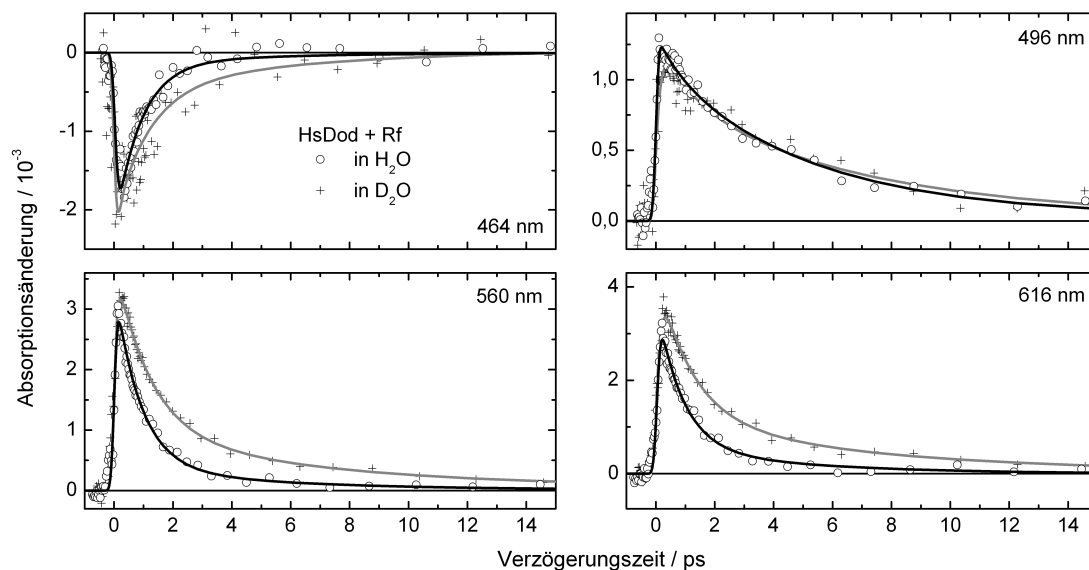


Abbildung 4.38: Transiente Absorptionsänderungen von HsDod-gebundenem Riboflavin in H₂O- und D₂O-Puffer nach Photoanregung bei 388 nm für einzelne ausgewählte Abtastwellenlängen. Die angegebene Absorptionsänderung bezieht sich auf HsDod-gebundenes Riboflavin in H₂O-Pufferlösung und die Absorptionsänderungen für HsDod-gebundenes Riboflavin in D₂O-Puffer wurden entsprechend der Absorption bei 388 nm normiert.

durchgeführt. An beide Datensätze konnten erfolgreich Fitfunktionen mit vier Zeitkonstanten angepasst werden, diese sind jeweils in Tabelle 4.3 wiedergegeben.

| | H ₂ O | D ₂ O | kinet. Isotopeneffekt |
|--------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| τ_1/ps | <0,2 | <0,2 | - |
| τ_2/ps | $0,9 \pm 0,2$ | $1,2 \pm 0,2$ | 1,3 |
| τ_3/ps | 5 ± 2 | 6 ± 2 | 1,2 |
| τ_∞ | ∞ | ∞ | - |

Tabelle 4.3: Ermittelte Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse der transienten Absorptionsdaten von HsDod-gebundenem Riboflavin in H₂O- und D₂O-Pufferlösung. Der kinetische Isotopeneffekt wurde als Quotient der Zeitkonstanten berechnet.

Eine kurze Zeitkonstante τ_1 liegt in beiden Fällen unterhalb der Zeitauflösung und beschreibt Effekte rund um den Zeitnullpunkt. Eine lange Zeitkonstante wurde eingesetzt um verbleibende Signale am Ende der Verzögerungszeit zu erfassen. Die Amplitude dieser Zeitkonstante liegt in beiden Fällen in der Größenordnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und ist zu vernachlässigen. In Abbildung 4.39 sind die zerfallenssoziierten Spektren der beiden anderen Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 gezeigt. τ_2 ist für HsDod-

gebundenes Riboflavin in deuterierter Pufferlösung um den Faktor 1,3 länger als für die nicht-deuterierte Probe. Die Amplitudenspektren sind jedoch sowohl in Bezug auf den spektralen Verlauf als auch auf die Intensität vergleichbar. Dies zeigt, dass die Dynamik durch den Austausch von Wasserstoff durch Deuterium verlangsamt wird und somit ein Protonentransfer maßgeblich an dem Prozess, der mit τ_2 stattfindet, beteiligt ist. Die Zeitkonstante τ_3 ist für die deuterierte Probe ebenfalls länger, allerdings zeigte eine Variation der Startbedingungen für die globale Fitanalyse, dass diese Zeitkonstante mit einem erheblichen Fehler behaftet ist (± 2 ps). Die transienten Signale der beiden Proben zeigen bei 496 nm einen sehr ähnlichen transienten Verlauf, weshalb hier auch eine ähnliche Zeitkonstante für HsDod-gebundenes Riboflavin in H_2O und D_2O erwartet würde. Dies muss bei der Diskussion der Daten berücksichtigt werden. Die zerfallensassoziierten Spektren für diese Zeitkonstante zeigen für die beiden Proben unterhalb von etwa 500 nm deutliche Gemeinsamkeiten, sowohl in der Intensität als auch im spektralen Verlauf. Bei etwa 610 nm zeigen beide zerfallensassoziierten Spektren ein lokales Maximum, die Amplitude ist im Falle der deuterierten Probe jedoch deutlich ausgeprägter.

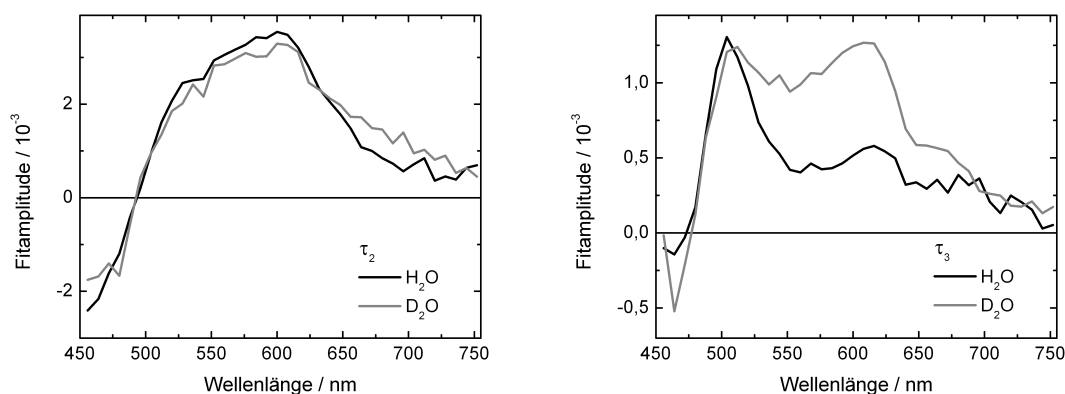


Abbildung 4.39: Zerfallensassoziierte Spektren der Zeitkonstanten τ_2 (links) und τ_3 (rechts) aus der globalen Fitanalyse von HsDod-gebundenem Riboflavin in H_2O - und D_2O -Pufferlösung.

Diskussion

Der Vergleich von HsDod-gebundenem Riboflavin in deuterierter Pufferlösung mit einer nicht-deuterierten Probe zeigt, dass die Lebensdauern der langwelligen Differenzsignale in der deuterierten Probe deutlich verlängert sind. Die Zeitkonstanten, die mit Hilfe einer globalen Fitanalyse erhalten wurden, bestätigen diese Beobachtungen und sind um den Faktor 1,3 bzw. 1,2 länger, als bei der nicht-deuterierten Probe. Dies ist ein Indiz dafür, dass ein Protonentransfer Teil beider Reaktionspfade ist. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Zeitkonstante τ_3 mit einem großen Fehler (± 2) behaftet ist und daher der kinetische Isotopeneffekt mit Vorsicht betrachtet werden muss, zumal bei 496 nm die transienten Absorptionsänderungen der Proben in H_2O und D_2O einen

nahezu identischen Verlauf aufweisen. In diesem Bereich besitzt das zerfallassozierte Spektrum von τ_3 für beide Proben ein lokales Maximum, während die zerfallassozierten Spektren von τ_2 hier einen Nulldurchgang besitzen. Die zerfallassozierten Spektren von τ_3 zeigen für HsDod-gebundenes Riboflavin in deuteriertem und nicht-deuteriertem Lösungsmittel unterschiedliche Amplituden um 600 nm. Für die Probe in D₂O wird eine deutlich höhere Amplitude beobachtet. Ursache hierfür könnte eine Beimischung des zerfallassozierten Spektrums von τ_2 mit einem Maximum um 600 nm sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass das entsprechende Zwischenprodukt, das mit τ_3 zerfällt tatsächlich in D₂O eine andere Oszillatorstärke in diesem Spektralbereich besitzt. Die spektrale Signatur des zerfallassozierten Spektrums der Zeitkonstante τ_3 mit einem lokalen Minimum bei etwa 550 nm und zwei Maxima bei 500 nm und 620 nm könnte auch durch die Überlagerung einer breiten positiven Amplitude zwischen 480 nm und 700 nm und der Überlagerung einer stimulierten Emission um 550 nm zu Stande kommen.

Der aus diesen Experimenten ermittelte Protonentransfer kann nun zum einen von Wassermolekülen auf das Flavin stattfinden, zum anderen, können Aminosäuren, die Wasserstoff durch ein Deuterium austauschen als Protonendonoren in Frage kommen. Die Tryptophanmoleküle werden ausgeschlossen, da sie einerseits keine direkten Wasserstoffbrücken zum Flavin, sondern eine Wasserstoffbrücke zu dem Aminosäurerest E38 ausbilden und andererseits, da sie im Grundzustand ihr Proton nicht abgeben und somit nicht austauschen. Weiterhin bildet ein Glutaminrest Wasserstoffbrücken zum Flavin aus, ist jedoch auch keine saure Aminosäure und wird daher auch nicht Wasserstoff gegen Deuterium austauschen. Der Aminosäurerest E45 kommt ebenfalls nicht als Protonendonor in Frage, da er lediglich zum Phosphatrückgrat, nicht aber zur Isoalloxazineinheit Wasserstoffbrücken ausbildet. Ein Austausch während des Lösungsprozesses scheint aufgrund der schnellen Reaktion nicht möglich, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Obwohl die Untersuchungen an den D41E- und D41S-Mutanten gezeigt haben, dass das wasserkoordinierte Magnesiumion unterhalb der Bindetasche für den Lösungsmechanismus nicht relevant ist, kommen weiterhin Wassermoleküle als Protonendonoren in Frage. Ist der Protonentransfer und die entsprechende Rückreaktion mit einem Elektronentransfer gekoppelt, so können diese beiden Schritte entweder nacheinander erfolgen, oder in einem konzertierten Mechanismus ablaufen. Wenn der Elektronentransfer vom Tryptophanrest auf das Flavin mit einem Protonentransfer auf das Flavin gekoppelt ist und diese beiden Prozesse innerhalb der Zeitauflösung des Experiments stattfinden, so kann keine Auskunft darüber gegeben werden, ob sie sequenziell oder konzertiert ablaufen. Bei dem Zerfall der positiven Signale und dem Grundzustandsbleichen beobachtet man einen kinetischen Isotopeneffekt, der nur dann auftreten kann, wenn das Proton an dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt ist. Somit kann zumindest ein geschwindigkeitsbestimmender Elektronenrücktransfer gefolgt von einem Protonentransfer ausgeschlossen werden, was für einen konzertierten Mechanismus spricht. Bei einem konzertierten Elektron-Proton-Transfermechanismus müssen das Elektron und das Proton nicht vom selben Molekül stammen. Man erwartet jedoch auch eine höhere Reorganisationsenergie und somit eine andere Elektronentransferrate, als für einen reinen Elektronentransfer [162]. Alternativ kann auch der Protonentransfer

auf das Flavin den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Wiedererlangung des Ausgangszustands darstellen.

4.4.7 HsDod mit Tryptophan-Derivaten

Nach den Ergebnissen für andere RfbP [3, 4, 109] kann man davon ausgehen, dass die Tryptophanreste in der Bindetasche einen erheblichen Anteil an der schnellen Wiedererlangung des Ausgangszustands nach Photoanregung des Flavins besitzen. Der einfachste Weg, um die Rolle der Tryptophane zu untersuchen ist eine Mutation, bei der die Tryptophane gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass die Flavine nicht kovalent gebunden, sondern nur über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen in der Bindetasche gehalten werden. Daher kommt nur ein Austausch der Tryptophanreste gegen andere aromatische Aminosäuren in Frage, die das Flavin ebenfalls durch $\pi\pi$ -Wechselwirkung in der Bindetasche fixieren können. Tyrosin ist hier ein möglicher Kandidat, der auch an der Bindung des Flavins im RfbP aus Hühnereiweiß beteiligt ist und dort die aromatische Triade (Tryptophan-Riboflavin-Tyrosin) vervollständigt [3, 4, 109, 163]. Es zeigte sich allerdings, dass beim Austausch der Tryptophanreste gegen Tyrosin die Affinität von HsDod für Flavine stark herabgesetzt wurde, so dass diese mutierten Proteine für transiente spektroskopische Untersuchungen nur schlecht geeignet waren. Eine Alternative besteht darin, anstelle der Tryptophanreste modifizierte Aminosäuren in das Protein einzubauen und dadurch die Elektronendonoreigenschaften dieser Reste im Vergleich zum Wildtyp zu verändern. So gelang es der Gruppe um N. Budisa (Technische Universität Berlin), modifizierte Tryptophane in das Dodecinmolekül einzubauen und so die Eigenschaften der Tryptophane zu verändern. Hierbei sollte vor allem die Ionisierungsenergie der Tryptophanreste modifiziert werden, um einen möglichen Elektronentransfer vom Tryptophan auf das Flavin zu erleichtern oder zu erschweren. Für die Modifikationen bietet sich vor allem die 4-Position des Tryptophans an, da in diesem Fall die Auswirkungen auf die Bindetasche am geringsten ausfallen. Die eingesetzten Tryptophan-Derivate sind in Abbildung 4.40 gezeigt.

Mit Hilfe von Rechnungen, die von A. Dreuw durchgeführt wurden, wurden drei Kandidaten ausgewählt. Die berechneten Ionisierungsenergien der entsprechenden Indoleinheit der Tryptophan-Derivate sind in Tabelle 4.4 im Vergleich zum Wildtyp (Indol) angegeben. Man erkennt, dass 4-Amino-Indol eine geringere Ionisierungsenergie besitzt als Indol, 4-Aza-Indol weist eine höhere Ionisierungsenergie auf. Die Ionisierungsenergie des 4-Fluoro-Indols ist in etwa vergleichbar mit der des Indols. Die Kristallstrukturanalyse der HsDod-Proteine mit den modifizierten Tryptophanen ergab, dass sich die Positionen der Aminosäuren und der Flavine im Verhältnis zum Wildtyp kaum verändert hatte, was wichtig für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist.

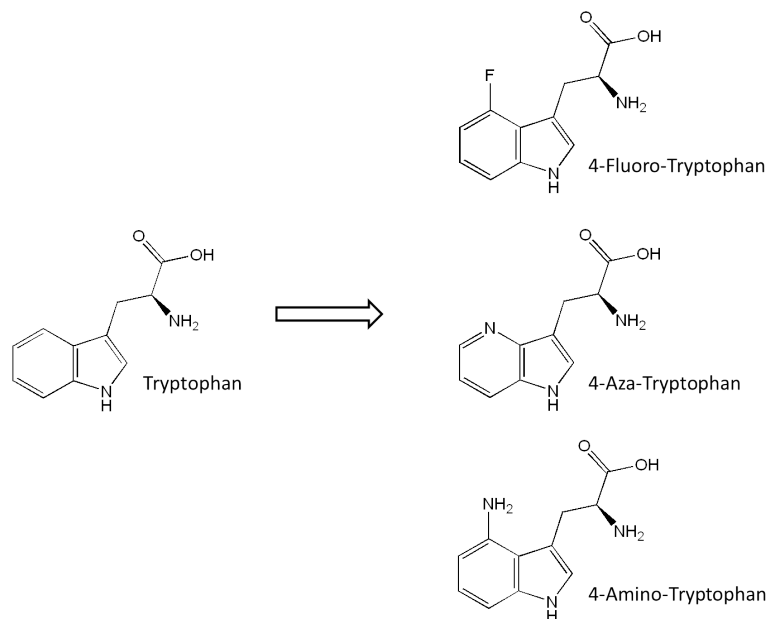


Abbildung 4.40: Strukturen der Tryptophan-Derivate, die anstelle von Tryptophan in HsDod eingebaut wurden.

| | Indol | 4-Fluoro-Indol | 4-Aza-Indol | 4-Amino-Indol |
|---------------------------|-------|----------------|-------------|---------------|
| Ionisierungsenergie / eV | 7,416 | 7,489 | 7,957 | 6,682 |
| Unterschied zu Indol / eV | - | + 0,073 | + 0,541 | - 0,734 |

Tabelle 4.4: Berechnete Ionisierungsenergien der verschiedenen Indolderivate, die als Basis für die im Dodecin eingesetzten Tryptophan-Derivate verwendet wurden. Die Daten stammen von A. Dreuw und wurden mit Q-Chem 3.2 mit DFT/B3LYP und dem Basissatz 6-31G* berechnet.

Statische Absorptionsspektroskopie

Abbildung 4.41 zeigt die statischen Absorptionsspektren des HsDod-gebundenen Riboflavins, sowie die Spektren von Riboflavin in den drei untersuchten Dodecinen mit Tryptophan-Derivaten. Man sieht deutliche Unterschiede zwischen den Spektren von Riboflavin gebunden in den verschiedenen Dodecinen mit Tryptophan-Derivaten, vor allem im Bereich der Absorption des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs. Im Vergleich zu Riboflavin gebunden in HsDod besitzt es in 4-Aza-Tryptophan-Dodecin (4-Aza-W-HsDod) eine deutlich geringere Absorption zwischen 450 nm und 500 nm, dafür aber eine ausgeprägtere Feinstruktur mit Maxima um 430 nm und 450 nm und einer Schulter um 480 nm. Riboflavin in 4-Fluoro-Tryptophan-Dodecin (4-Fluoro-W-HsDod) zeigt ein Absorptionsmaximum bei 354 nm und eine geringere Absorption im Bereich des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs

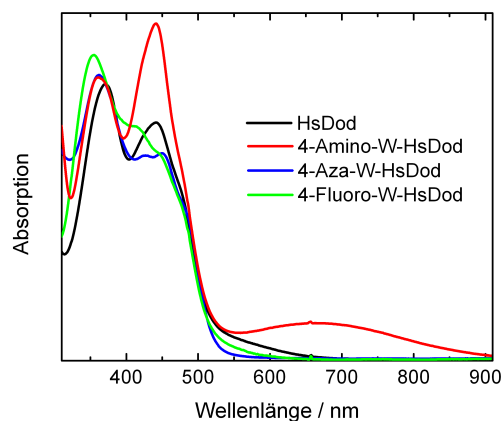


Abbildung 4.41: Statische Absorptionsspektren von Riboflavin gebunden in HsDod mit verschiedenen Tryptophan-Derivaten. Die Abbildung zeigt die Spektren zwischen 300 nm und 900 nm zur Verdeutlichung der Unterschiede im Bereich des $S_0 \rightarrow S_1$ - und $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs von Riboflavin, sowie der Absorption des CT-Zustands des 4-Amino-Trp-Dodecins zwischen 550 nm und 900 nm. Die Spektren wurden anhand der Absorption bei 373 nm normiert.

mit einer deutlichen Feinstruktur mit Maxima um 415 nm und 450 nm. Auch bei Riboflavin eingebaut in das Fluoro-Analogon ist eine Schulter um 480 nm zu beobachten. Riboflavin in 4-Amino-Tryptophan-Dodecin (4-Amino-W-HsDod) zeigt im Vergleich zum HsDod-gebundenen eine stärkere Absorption im Bereich des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs ohne Feinstruktur und lediglich einer Schulter um 480 nm. Zwischen 550 nm und 900 nm beobachtet man bei 4-Amino-W-HsDod-gebundenem Riboflavin jedoch eine breite Absorptionsbande, die weder bei HsDod noch bei den anderen Dodecinen mit Tryptophan-Derivaten zu beobachten ist. Diese breite Absorption wurde auch schon von anderen Gruppen beobachtet, wenn Flavine mit aminosubstituierten Aromaten in räumliche Nähe gebracht wurden [120]. Dieses Phänomen ist vermutlich auf die Ausbildung eines Charge-Transfer-(CT)-Komplexes zwischen dem Flavin und dem aminosubstituierten Aromaten, in unserem Fall des 4-Amino-Tryptophans, zurückzuführen. Die ausgeprägten Elektronendonoreigenschaften von aminosubstituierten Tryptophanen in Proteinen und die damit verbundene bathochrome Verschiebungen der Absorptionsbanden der Chromophore konnte bereits für das grün fluoreszierende Protein (GFP) beobachtet werden [164]. Die spektralen Unterschiede der Proben können auch mit bloßem Auge bei der Betrachtung der Probelösungen festgestellt werden. So zeigt das 4-Amino-W-HsDod eine deutliche Grünfärbung, während die anderen Proben alle gelb gefärbt sind (Abbildung 4.42). Für die gelbe Farbe der Proben ist die Absorption des Flavins verantwortlich. Beim 4-Amino-W-HsDod-gebundenen Riboflavin besitzt die Probe aufgrund der Ausbildung eines CT-Komplexes zwischen der 4-Amino-Indoleinheit und dem Flavin eine zusätzliche Absorptionsbande um 700 nm, wodurch die Probe grün erscheint.



Abbildung 4.42: Proben von HsDod, 4-Fluoro-W-HsDod, 4-Aza-W-HsDod und 4-Amino-W-HsDod, jeweils besetzt mit Riboflavin. Die Absorption des Riboflavins ist für die gelbe Farbe der ersten drei Proben verantwortlich. Bei 4-Amino-W-HsDod kommt es durch die Ausbildung eines CT-Zustands zu einer Grünfärbung.

Transiente Absorptionsspektroskopie

In Abbildung 4.43 ist eine Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen von Riboflavin, eingebaut in die verschiedenen Dodecin-Analoga mit Tryptophan-Derivaten, im Vergleich zu in natürlichem HsDod gebundenem gezeigt. Zur Verdeutlichung des unterschiedlichen Verhaltens der einzelnen Dodecin-Analoga sind in Abbildung 4.44 die transienten Absorptionsänderungen für ausgesuchte Wellenlängen gezeigt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Dynamiken wurden die transienten Absorptionsänderungen jeweils für jede Abtastwellenlänge auf das Signal für HsDod-gebundenes Riboflavin direkt nach der Photoanregung normiert. Informationen über die Signalintensitäten der unterschiedlichen Proben geben die Absorptionsänderungen zu unterschiedlichen Verzögerungszeiten (0,3 ps und 5 ps) in Abbildung 4.45. Die Unterschiede zum Riboflavin gebunden in natürlichem HsDod sind teilweise sehr ausgeprägt und werden im Folgenden einzeln diskutiert.

4-Fluoro-W-HsDod

Betrachtet man die berechneten Ionisierungsenergien von 4-Fluoro-Indol und Indol im Vergleich zu denen der anderen Indol-Derivate, auf denen die eingebauten Tryptophan-Derivate basieren, so besteht zwischen diesen beiden nur ein geringer Unterschied (siehe Tabelle 4.4). Entsprechend würde man, wenn ein Elektronentransfer vom Tryptophan auf das photoangeregte Flavin der zentrale Schritt des Lösungsmechanismus ist, nur einen geringen Unterschied zwischen den Ergebnissen für 4-Fluoro-W-HsDod- und HsDod-gebundenes Riboflavin erwarten. Und tatsächlich zeigen die transienten Daten für 4-Fluoro-W-HsDod-gebundenes Riboflavin bei 512 nm nur geringe Abweichungen von denen für Riboflavin, eingebaut in das natürliche HsDod. Im Bereich der positiven Absorptionsänderungen oberhalb von etwa 550 nm zeigen die Daten von Riboflavin in dem Fluoro-Analoga auch deutlich geringere Abweichungen von denen in HsDod, sowohl in der Intensität (Abbildung 4.45) als auch in der Dynamik der Signale (Abbildung 4.44),

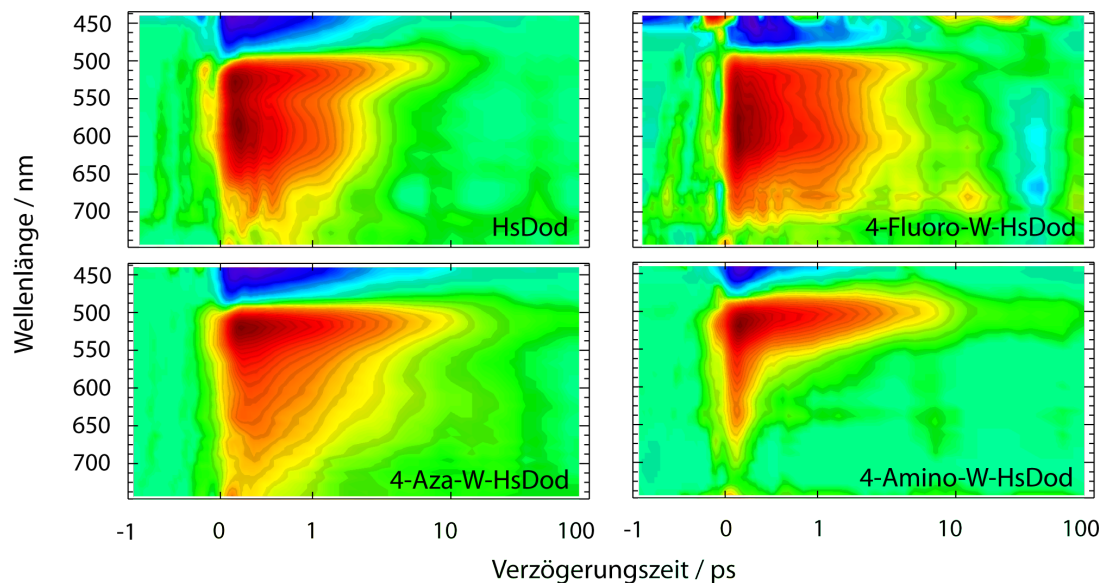


Abbildung 4.43: Übersicht über die transienten Absorptionsänderungen des Riboflavins eingebaut in HsDod, sowie in die HsDod-Analoga 4-Fluoro-W-HsDod, 4-Aza-W-HsDod und 4-Amino-W-HsDod nach Photoanregung bei 388 nm.

als die beiden anderen untersuchten HsDod-Analoga. Insgesamt sind die beobachteten Lebensdauern in diesem Spektralbereich jedoch ein wenig länger als die von Riboflavin in HsDod. Dies wird besonders bei der Betrachtung der Absorptionsänderungen bei den einzelnen ausgewählten Abtastwellenlängen von 568 nm und 608 nm (Abbildung 4.44 unten) sowie den Absorptionsänderungen bei einer Verzögerungszeit von 5 ps (Abbildung 4.45 rechts) deutlich. Im Bereich des Grundzustandsbleichens bei 472 nm zeigt 4-Fluoro-W-HsDod-gebundenes Riboflavin ein geringer ausgeprägtes Signal, was aber vermutlich auf die spektralen Unterschiede der Proben zurückzuführen ist (siehe Abbildung 4.41).

4-Aza-W-HsDod

4-Aza-W-Trp-gebundenes Riboflavin zeigt für die positiven Signale im gesamten untersuchten Spektralbereich zu kurzen Verzögerungszeiten geringere Signalintensität als Riboflavin in dem natürlichen HsDod (Abbildung 4.45 links), sowie eine längere Lebensdauer der Signale (Abbildung 4.44, 4.45 rechts). Im Bereich um 500 nm ist der Unterschied in der Signalintensität weniger ausgeprägt, als in den anderen spektralen Bereichen. Das Grundzustandsbleichen zeigt im untersuchten spektralen Bereich eine etwas längere Lebensdauer als bei dem HsDod-gebundenen Riboflavin (Abbildung 4.44 oben, links).

4-Amino-W-HsDod

Die Daten von 4-Amino-W-HsDod- zeigen im Vergleich zu HsDod-gebundenem Riboflavin

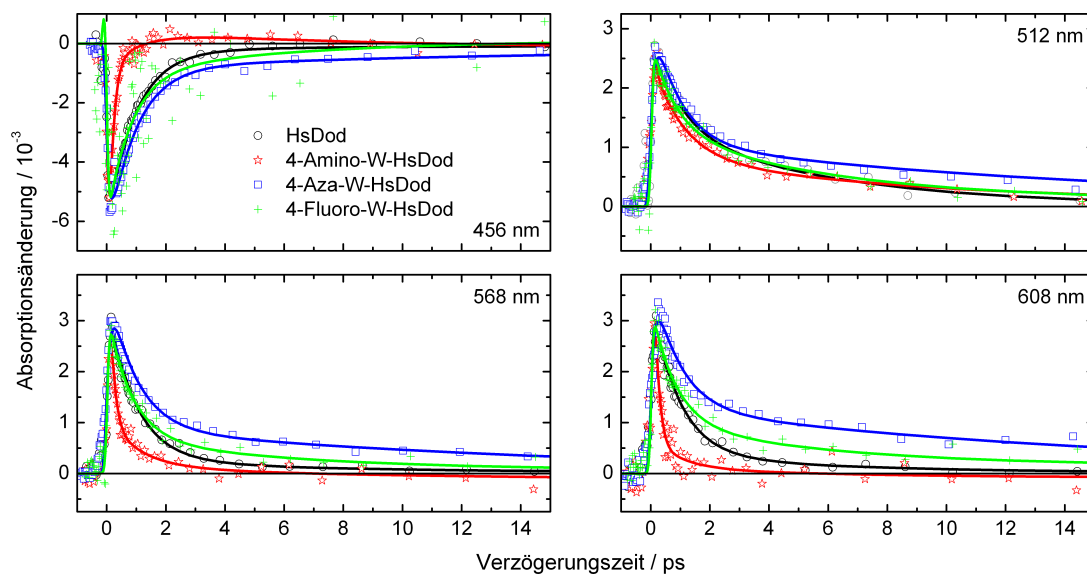


Abbildung 4.44: Transiente Absorptionsänderungen bei vier ausgewählten Abtastwellenlängen von Riboflavin eingebaut in HsDod sowie in die HsDod-Analoga 4-Fluoro-W-HsDod, 4-Aza-W-HsDod und 4-Amino-W-HsDod. Die transienten Absorptionsänderungen sind anhand der Signale von HsDod-gebundenem Riboflavin direkt nach der Photoanregung normiert. Die angegebenen Absorptionsänderungen beziehen sich auf HsDod-gebundenes Riboflavin.

ein deutlich anderes transientes Verhalten. Vor allem im Bereich des Grundzustandsbleichens und im Bereich der positiven Absorptionsänderung oberhalb von 550 nm zeigt diese Probe nicht nur eine deutlich geringere Signalintensität (Abbildung 4.45), sondern auch eine erheblich kürzere Lebensdauer der Differenzsignale (Abbildung 4.44). Es ist außerdem auffällig, dass um 500 nm (512 nm in Abbildung 4.44 oben, rechts) die Lebensdauer des positiven Signals in etwa die gleiche Lebensdauer besitzt wie das Signal des HsDod-gebundenen Riboflavins und somit deutlich länger ist, als die der Signale im übrigen untersuchten Spektralbereich.

Bei den Ergebnissen für 4-Amino-W-HsDod fällt auf, dass im Bereich der CT-Bande um 700 nm in den transienten Daten kein Grundzustandsbleichen zu beobachten ist. Dies liegt vermutlich an der geringen Intensität und der Breite der Bande und den entsprechend kleinen Differenzsignalen. Zudem können positive Differenzsignale das Grundzustandsbleichen überlagern.

Globale Fitanalyse

Während die Daten für 4-Aza-W-HsDod- und 4-Fluoro-W-HsDod-gebundenes Riboflavin erfolgreich in einer globalen Fitanalyse mit vier Zeitkonstanten beschrieben werden konnten, waren für die Anpassung der globalen Fitfunktion an die Daten von 4-Amino-W-HsDod-gebundenem fünf Zeitkonstanten notwendig. Die jeweiligen Zeitkonstanten

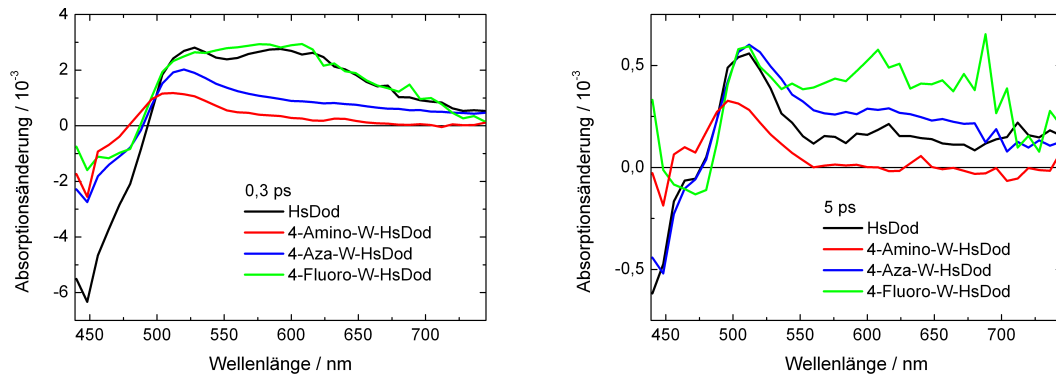


Abbildung 4.45: Absorptionsänderungen bei 0,3 ps (links) und 5 ps (rechts) für Riboflavin eingebaut in HsDod sowie in die HsDod-Analoga 4-Fluoro-W-HsDod, 4-Aza-W-HsDod und 4-Amino-W-HsDod. Die Absorptionsänderungen sind anhand der Absorption bei 388 nm in den statischen Spektren normiert. Die angegebenen Absorptionsänderungen beziehen sich auf HsDod-gebundenes Riboflavin.

sind in Tabelle 4.5 angegeben. Abbildung 4.46 zeigt die zugehörigen zerfallassozierten Spektren. Die Ergebnisse für Riboflavin eingebaut in die Dodecin-Analoga und das natürliche Dodecin werden im Folgenden einzeln dargestellt und diskutiert.

| | HsDod | Fluoro-W-HsDod | 4-Aza-W-HsDod | 4-Amino-W-HsDod4 |
|--------------------|---------------|----------------|---------------|------------------|
| τ_1/ps | <0,13 | <0,13 | <0,13 | < 0,13 |
| τ_2/ps | $0,9 \pm 0,2$ | $0,8 \pm 0,2$ | $0,9 \pm 0,2$ | $0,13 \pm 0,05$ |
| τ_3/ps | 6 ± 2 | 6 ± 2 | 15 ± 3 | $1,0 \pm 0,2$ |
| τ_4/ps | | | | 8 ± 2 |
| τ_∞ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ |

Tabelle 4.5: Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse von HsDod-, 4-Fluoro-W-HsDod-, 4-Aza-W-HsDod- und 4-Amino-W-HsDod-gebundenem Riboflavin.

4-Fluoro-W-HsDod

Für 4-Fluoro-W-HsDod-gebundenes Riboflavin konnten in einer globalen Fitanalyse vier Zeitkonstanten ermittelt werden. Die kürzeste Zeitkonstante τ_1 liegt deutlich unterhalb der Zeitauflösung des Experiments und wird daher nicht näher diskutiert. Weiterhin wurde eine lange Zeitkonstante $\tau_\infty = \infty$ für die Fitanalyse eingesetzt, deren Amplitude aber über den gesamten untersuchten Spektralbereich vernachlässigbar klein und im Bereich des Rauschens liegt. Zwei weitere Zeitkonstanten $\tau_2 = 0,8$ ps und $\tau_3 = 6$ ps liegen in der Größenordnung von τ_2 und τ_3 aus der globalen Fitanalyse für Riboflavin in dem natürlichen HsDod, für das hier 0,9 ps und 6 ps ermittelt werden konnte. Auch die spektrale Signatur der zerfallassozierten Spektren für diese beiden Zeitkonstanten

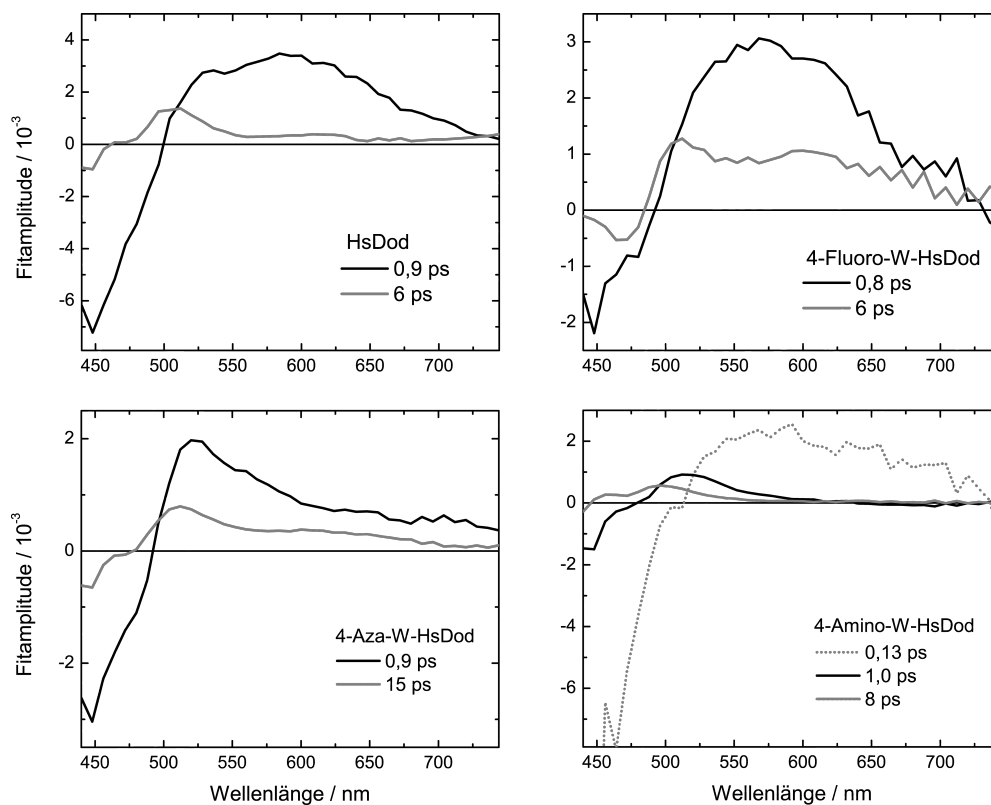


Abbildung 4.46: Zerfallenssoziierte Spektren der globalen Fitanalyse von HsDod-, 4-Fluoro-W-HsDod-, 4-Aza-W-HsDod- und 4-Amino-W-HsDod-gebundenem Riboflavin. Die zerfallenssoziierten Spektren wurden jeweils auf die Absorption von HsDod im statischen Absorptionsspektrum bei 388 nm normiert um eine Vergleichbarkeit der Fitamplituden zu gewährleisten. Sie entsprechen somit den in Abbildung 4.44 gezeigten transienten Absorptionsänderungen.

zeigt eine gute Übereinstimmung mit den zerfallenssoziierten Spektren für das HsDod-gebundene Riboflavin. Insgesamt ist jedoch die Amplitude für τ_2 im Falle des Fluoro-Analogons kleiner als für den Fall des natürlichen HsDods und im Bereich oberhalb von 550 nm zeigt das zerfallenssoziierte Spektrum von τ_3 für 4-Fluoro-W-HsDod-gebundenes Riboflavin eine höhere positive Amplitude als für HsDod-gebundenes. Dies spiegelt die Beobachtungen wieder, dass die Signale des Fluoroanalogons in diesem Spektralbereich eine längere Lebensdauer aufweisen, die bereits bei der Betrachtung der transienten Daten beschrieben wurde.

4-Aza-W-HsDod

An die Daten für 4-Aza-W-HsDod-gebundenes Riboflavin konnte erfolgreich eine Fitfunktion mit vier Zeitkonstanten angenähert werden. Die kurze Zeitkonstante $\tau_1 < 0,13$ ps liegt unterhalb der Zeitauflösung des Experiments und ist durch Effekte um den Zeit-

nullpunkt stark beeinflusst. Sie wird daher nicht näher diskutiert. Die Zeitkonstante $\tau_2 = 0,9$ ps zeigt eine negative Amplitude unterhalb von etwa 490 nm, die dem Zerfall des Grundzustandsbleichens und somit der Rückkehr in den anfänglichen Grundzustand zugeordnet wird. Oberhalb von 490 nm zeigt das zerfallassozierte Spektrum eine positive Amplitude mit einem Maximum um 525 nm, die den Zerfall des positiven Differenzsignals in diesem spektralen Bereich anzeigt. Das zerfallassozierte Spektrum einer weiteren Zeitkonstante $\tau_3 = 15$ ps besitzt eine ähnliche spektrale Signatur wie das der τ_3 -Zeitkonstante von HsDod und trägt entsprechend zum Zerfall des Grundzustandsbleichens sowie des positiven Signals um 500 nm bei. Die Zeitkonstante ist aber deutlich länger für das Aza-Analogon. Das zerfallassozierte Spektrum für $\tau_\infty = \infty$ besitzt nahezu keine Amplitude und wird daher nicht weiter diskutiert.

4-Amino-W-HsDod

Um an die Daten von 4-Amino-W-HsDod-gebundenem Riboflavin erfolgreich eine Funktion in einer globalen Fitanalyse anpassen zu können, wurden 5 Zeitkonstanten benötigt. Eine kurze Zeitkonstante τ_1 liegt deutlich unterhalb der Zeitauflösung des Experiments und wird ebenso wie $\tau_\infty = \infty$, das keine nennenswerte Amplitude besitzt, nicht weiter diskutiert. Die Zeitkonstante $\tau_2 = 0,13$ ps liegt im Bereich der Zeitauflösung des Experiments und das zugehörige zerfallassozierte Spektrum zeigt eine gute spektrale Übereinstimmung mit dem der τ_2 -Zeitkonstante des HsDod-gebundenen Riboflavins. Der Nulldurchgang ist dabei jedoch etwas bathochrom verschoben, was aber auf die spektralen Unterschiede im statischen Absorptionsspektrum zurückgeführt werden kann (siehe Abbildung 4.41). Das zerfallassozierte Spektrum der Zeitkonstante $\tau_3 = 1,0$ ps zeigt eine gute spektrale Übereinstimmung mit dem zerfallassozierten Spektrum von $\tau_3 = 6$ ps für HsDod-gebundenes Riboflavin, aber auch hier ist der Nulldurchgang sowie das Maximum der positiven Amplitude bei etwa 500 nm etwas bathochrom verschoben. Eine weitere Zeitkonstante $\tau_4 = 8$ ps besitzt eine geringe positive Amplitude zwischen etwa 450 nm und 550 nm mit einem Maximum bei etwa 490 nm.

Im Bereich oberhalb von 600 nm zeigen die zerfallassozierten Spektren der Zeitkonstanten τ_3 und τ_4 keine signifikante Amplitude, während bei dem natürlichen HsDod und den anderen HsDod-Analoga bei den Zeitkonstanten τ_3 hier positive Amplituden zu beobachten sind. Dies könnte auf das Grundzustandsbleichen der CT-Bande zurückzuführen sein, das in diesem Spektralbereich ein mögliches positives Signal überlagert.

Einzelkanal-Fitanalyse im Bereich des Grundzustandsbleichens

Die globalen Fitanalysen der Daten für HsDod- und 4-Aza-W-HsDod-gebundenes Riboflavin ergeben für τ_2 für beide Proben vergleichbare Zeitkonstanten von 0,9 ps. Unter der Annahme, dass diese Zeitkonstante einen Elektronenrücktransfer vom Riboflavinsemichinon auf das Tryptophanradikal beschreibt, würde man aufgrund der unterschiedlichen Ionisierungsenergien der Indoleinheiten unterschiedliche Zeitkonstanten erwarten. Im Bereich des Grundzustandsbleichens (Abbildung 4.44 oben, links) zeigen die transienten Daten auch unterschiedliche Lebensdauern. Um diese Beobachtung näher verifizieren

zu können, wurde für HsDod-, 4-Aza-W-HsDod- und 4-Amino-W-HsDod-gebundenes Riboflavin bei einer Abtastwellenlänge von 456 nm jeweils ein exponentieller Zerfall ($\Delta A = a \cdot e(-t/\tau)$) mit einer Zeitkonstanten τ und der Amplitude a an die Daten zu positiven Verzögerungszeiten angepasst (Abbildung 4.47). Die Zeitkonstanten sind in Tabelle 4.6 wiedergegeben.

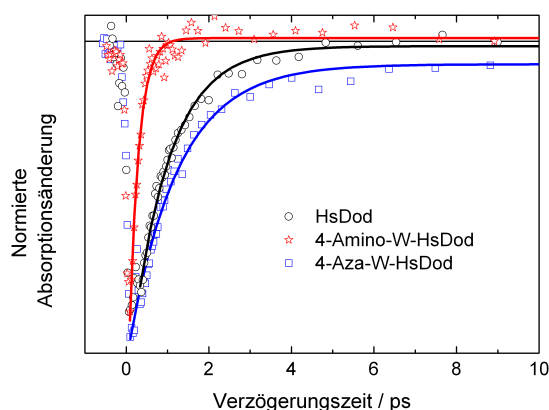


Abbildung 4.47: Die transienten Absorptionsänderungen für HsDod-, 4-Aza-W-HsDod- und 4-Amino-W-HsDod bei einer Abtastwellenlänge von 456 nm mit den Kurven eines exponentiellen Zerfalls mit einer Zeitkonstanten und einem konstanten Offset, die jeweils an die Daten angepasst wurden.

| | HsDod | 4-Aza-W-HsDod | 4-Amino-W-HsDod4 |
|------------------|---------------|---------------|------------------|
| τ/ps | $0,9 \pm 0,1$ | $1,2 \pm 0,1$ | $0,23 \pm 0,05$ |

Tabelle 4.6: Zeitkonstanten und Amplituden aus der Einzelkanal-Fitanalyse von HsDod-, 4-Aza-W-HsDod- und 4-Amino-W-HsDod-gebundenem Riboflavin bei 456 nm.

Die Zeitkonstanten des Einzelkanal-Fits zeigen deutlich, dass die Dynamik für 4-Aza-W-HsDod-gebundenes Riboflavin langsamer ist als für HsDod-gebundenes. Für 4-Amino-W-HsDod-gebundenes Riboflavin ist die Dynamik am schnellsten. Für 4-Aza-W-HsDod geht die Absorptionsänderung im betrachteten Zeitfenster nicht auf Null zurück. Dies deutet an, dass hier noch eine weitere längere Zeitkonstante für die Beschreibung des Zerfalls des Grundzustandsbleichens notwendig wäre. Dies spiegelt auch die Zeitkonstante τ_3 aus der globalen Fitanalyse wieder, die im Falle des Aza-Analogons länger ist als für die anderen Proben und in diesem Spektralbereich eine negative Amplitude besitzt.

Diskussion

Wie aufgrund der nur leicht unterschiedlichen Ionisierungsenergien erwartet, fällt der Unterschied in den transienten Daten zwischen 4-Fluoro-W-HsDod- und HsDod-gebundenem

Riboflavin gering aus. Der Unterschied zu den anderen beiden HsDod-Analoga hingegen ist deutlich zu erkennen. Für das Amino-Analogon ist die Ionisierungsenergie der 4-Amino-Indoleinheit etwa 0,7 eV kleiner als für die Indoleinheit des natürlichen HsDods. Daher wird erwartet, dass der Zustand nach dem Elektronentransfer (ET-Zustand) im Falle des 4-Amino-W-HsDods energetisch unterhalb dessen für HsDod liegt. Dies ist schematisch in Abbildung 4.48 dargestellt. Es wird angenommen, dass sich die Potentiale für den Ausgangszustand und den photoangeregten Zustand nicht ändern, wenn anstelle des natürlichen Tryptophans Tryptophan-Derivate in das Protein eingebaut werden und dass sich das Potential des ladungsseparierten Zustands jeweils um den Betrag absenkt oder anhebt, welcher der Differenz der Ionisierungsenergien entspricht (siehe Tabelle 4.4). Daraus folgt für das Amino-Analogon, dass ΔG^0 für den Elektronentransfer von 4-Amino-Tryptophan auf das photoangeregte Riboflavinmolekül etwa -1,1 eV und für den Elektronenrücktransfer etwa -1,2 eV beträgt. Die Zeitkonstante τ_2 , die den Zerfall des breiten positiven Signals oberhalb von 500 nm und die Wiederbesetzung des Grundzustands beschreibt und nach den bisherigen Ergebnissen vermutlich einem Protonentransfer-gekoppelten Elektronenrücktransfer von einem Riboflavinsemichinon auf ein Tryptophanradikalkation zuzuschreiben ist, ist für 4-Amino-W-HsDod deutlich schneller als für die anderen Spezies. Nach der von Moser und Dutton semiempirisch aufgestellten Formel (siehe Kapitel 4.4.1, Formel 4.3) [126, 127] würde man für das Amino-Analogon eine höhere Rate für den Elektronenrücktransfer, also eine schnellere Zeitkonstante, erwarten, wenn ΔG^0 größer als die Reorganisationsenergie λ ist und man sich so im invertierten Marcus-Bereich befindet. Ein geringerer Energieunterschied zwischen dem ladungsseparierten Zustand und dem anfänglichen Ausgangszustand würde somit zu einer kürzeren Zeitkonstante führen. Die starke Abhängigkeit dieser Zeitkonstante von der Art des Tryptophan-Derivats impliziert eine Beteiligung des Tryptophans an dem zugehörigen Prozess. Die Ergebnisse des Einzelkanal-Fits im Bereich des Grundzustandsbleichens bestätigen die schnellere Zeitkonstante für die Rückkehr in den Ausgangszustand für das 4-Amino-W-HsDod-gebundene Riboflavin im Vergleich zu HsDod.

Für das Aza-Analogon wäre unter den oben genannten Annahmen für den Elektronentransfer von 4-Aza-Tryptophan auf das photoangeregte Flavin ein ΔG^0 -Wert von etwa +0,1 eV zu erwarten. Die entsprechenden Potentialflächen der beteiligten Spezies sind in Abbildung 4.48 schematisch dargestellt. Trotz des positiven Werts kann nach Moser und Dutton ein Elektronentransfer stattfinden, sollte aber bedeutend langsamer ablaufen [128]. Zusätzlich muss von der durch Formel 4.3 beschriebenen Elektronentransferrate für Reaktionen mit negativem ΔG^0 ein Wert von $\Delta G^0/0,06$ abgezogen werden. Der Wert 0,06 ergibt sich aus der Boltzmann-Verteilung bei Raumtemperatur. So ergibt sich insgesamt für die Elektronentransferrate für $\Delta G^0 > 0$:

$$\log_{10}k = 13 - 0,6(R - 3,6) - \frac{3,1(\Delta G^0 + \lambda)^2}{\lambda} - \frac{\Delta G^0}{0,06} \quad (4.5)$$

Hierbei werden R in Å, ΔG^0 und λ in eV eingesetzt.

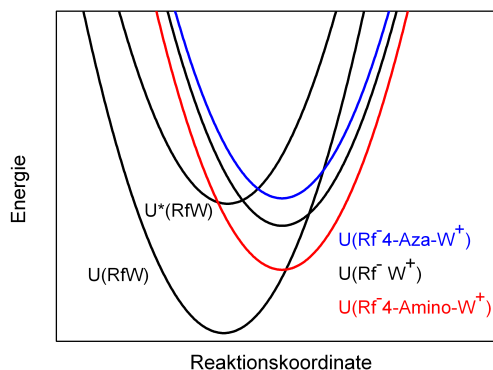


Abbildung 4.48: Schematische Darstellung der Potentiale U , die für einen Elektronentransfer von einem Tryptophan auf das Riboflavinmolekül nach Photoanregung und den Elektronenrücktransfer relevant sind. Gezeigt sind die potentiellen Energien für HsDod im Ausgangsgrundzustand ($U(RfW)$), nach Photoanregung des Riboflavins ($U^*(RfW)$) und der ladungsseparierte Zustand ($U(Rf^-W^+)$) für HsDod (schwarz), 4-Aza-W-HsDod (blau) und 4-Amino-W-HsDod (rot).

Danach ergäbe sich bei einer angenommenen Reorganisationsenergie von 0.7 eV für den Elektronentransfer eine Zeitkonstante von einigen Nanosekunden. Die transienten Daten weisen jedoch keine stimulierte Emission des Flavins um 550 nm auf und deuten somit darauf hin, dass bereits innerhalb der Zeitauflösung des Experiments der angeregte Zustand des Flavins depopuliert wird. Eine Rolle bei der schnellen Entvölkerung des angeregten Zustands und der Wiedererlangung des Ausgangszustands könnte die Tatsache spielen, dass sich Riboflavin und Tryptophan in der Bindetasche so nahe kommen, dass sie in van-der-Waals-Kontakt stehen und der zweite Schritt, also der Elektronenrücktransfer sehr schnell abläuft und somit der ungünstige ladungsseparierte Zustand schnell wieder entvölkert wird. Für den Elektronenrücktransfer liegt der abgeschätzte Wert für ΔG^0 bei etwa 2,5 eV. Demnach sollte der Elektronenrücktransfer für den invertierten Fall der Marcus-Theorie langsamer verlaufen, als für HsDod-gebundenes Riboflavin. Die Zeitkonstante τ_2 aus der globalen Fitanalyse spiegelt diese Erwartungen nicht wieder, sie ist für HsDod- und 4-Aza-W-HsDod-gebundenes Riboflavin etwa gleich. In den Einzelkanal-Fitanalysen im Bereich des Grundzustandsbleichsignals zeichnet sich jedoch ein entsprechender Trend ab. Zwar zeigen die transienten Absorptionsänderungen für 4-Aza-W-HsDod-gebundenes Riboflavin einen deutlich langsameren Zerfall, besonders im Spektralbereich oberhalb von etwa 550 nm, dies liegt jedoch hauptsächlich an der vergleichsweise hohen Amplitude für die Zeitkonstante τ_3 , die zudem etwa dreimal so lang ist wie für HsDod-gebundenes Riboflavin. Das zerfallassozierte Spektrum für τ_2 des 4-Aza-W-HsDod-gebundenen Riboflavins weist eine deutlich andere spektrale Signatur auf, als die der Zeitkonstanten τ_2 für HsDod und die anderen HsDod-Analoga. Unter der Annahme, dass das zerfallassozierte Spektrum von einem Tryptophanradikal dominiert wird, ist dies nicht verwunderlich. Das kationische Radikal des 4-Aza-Tryptophans kann durchaus ein anderes Absorptionsspektrum besitzen als ein unmodifiziertes Trypto-

phanradikal. Die stärkere Abweichung des entsprechenden Absorptionsspektrums im Vergleich zu den anderen beiden eingesetzten Tryptophan-Derivaten liegt vermutlich darin begründet, dass beim 4-Aza-Tryptophan ein Fremdatom (Stickstoff) in das Isoalloxazinringsystem eingebracht wurde. Bei den anderen beiden ist jeweils der Wasserstoff an der 4-Position durch eine Fluoro- oder Amino-Gruppe substituiert.

Die Zeitkonstante τ_3 zeigt für alle drei Analoga eine ähnliche spektrale Signatur im zerfallassozierten Spektrum wie für das natürliche HsDod und ist somit ein Hinweis darauf, dass sie ähnliche Prozesse beschreibt. Für 4-Amino-W-HsDod ist sie mit 1,0 ps deutlich kürzer als für das natürliche HsDod und das 4-Fluoro-W-HsDod, während sie für 4-Aza-W-HsDod mit 15 ps deutlich länger ist. Die zu dieser Zeitkonstante gehörende Dynamik scheint somit ebenfalls von der Auswahl des Tryptophan-Derivats abzuhängen. Die spektrale Signatur ist jedoch für alle Proben sehr ähnlich, was darauf schließen lässt, dass das zugehörige transiente Signal nicht von einer Tryptophanspezies stammt. Dies wurde auch schon durch die Ergebnisse an HsDod-gebundenem FAD angedeutet. Obwohl diese Zeitkonstante den Zerfall des Signals zwischen 500 nm und 550 nm beschreibt, fällt bei der Betrachtung der Daten des Amino-Analogons auf, dass um 500 nm ein positives Signal mit einer deutlich längeren Zeitkonstante von $\tau_4 = 8$ ps zerfällt. Bei dieser Wellenlänge besitzen alle vier Proben ein Signal mit einer ähnlichen Lebensdauer. Bei HsDod-, 4-Fluoro-HsDod- und 4-Aza-W-HsDod-gebundenem Riboflavin könnten zwei ähnlich schnelle Prozesse in der Zeitkonstante τ_3 zusammengefasst werden, während bei dem Amino-Analogon die Zeitkonstanten deutlich unterschiedlich sind und daher beide als signifikant auftreten. Es ist auch möglich, dass die Zeitkonstanten τ_3 und τ_4 beide Kühlprozessen zuzuordnen sind.

4.4.8 Dodecin aus *Halorhodospira halophila* mit Riboflavin

Neben *Halobacterium salinarum* gibt es noch einige weitere Spezies, die Dodecine enthalten. Einige wurden bereits in Kapitel 4.1.2 vorgestellt. Der natürliche Cofaktor von HhDod ist FMN, es bindet aber auch Riboflavin, was hier zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der unterschiedlichen Dodecine genutzt wurde. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 gezeigt, werden auch in HhDod die beiden Flavine in einer aromatischen Tetrade zwischen zwei Tryptophanresten gebunden. Allerdings sind sie aufgrund der abweichenden Struktur der Bindetasche anders angeordnet. Der wohl augenscheinlichste Unterschied liegt darin, dass die Flavine in HsDod mit ihren *re*-Seiten zueinander angeordnet sind, während sie in HhDod, wie auch in anderen bakteriellen Dodecinen, mit ihren *si*-Seiten zueinander stehen. Zudem sind die Tryptophane in HhDod ein wenig verkippt, so dass die Anordnung der Tetrade weniger kompakt ist als im archaealen Dodecin. Die Abstände sind jedoch vergleichbar. Mit Hilfe der Dodecin-Proteine aus den beiden Spezies soll untersucht werden, ob die genannten Unterschiede in der Flavin-Bindetasche zu voneinander abweichenden Ergebnissen führen, was auf verschiedene Aufgaben der Dodecin-Proteine in den beiden Spezies hindeuten könnte und schon durch die unterschiedlichen Cofaktoren *in vivo* impliziert wird.

Statische Absorptionsspektroskopie

In Abbildung 4.49 ist das statische Absorptionsspektrum von HhDod-gebundenem Riboflavin im Vergleich zu Riboflavin in wässriger Pufferlösung und gebunden in HsDod gezeigt. Man erkennt, dass sich die Lage der Maxima im Vergleich zum freiem Riboflavin kaum verschiebt. Die Schulter um 480 nm, die man bei HsDod-gebundenem Riboflavin beobachtet, ist bei HhDod-gebundenem Riboflavin kaum auszumachen. Lediglich oberhalb von etwa 530 nm erkennt man, dass die Dodecin-Proben beide noch eine deutliche Absorption aufweisen, während ungebundenes Riboflavin hier keine Absorption mehr besitzt. Die Absorption des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs wird im Vergleich zum $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang erhöht, wenn Riboflavin in HhDod eingebaut wird. Für HsDod-gebundenes Riboflavin ist sie erniedrigt. Dies deutet auf unterschiedliche Wechselwirkungen des Flavins in der HhDod-Bindetasche im Vergleich zu HsDod hin. So könnte die deutlich weniger ausgeprägte Schulter bei 480 nm ein Hinweis auf eine geringere $\pi\pi$ -Wechselwirkung der Flavine untereinander und mit den Tryptophanresten sein.

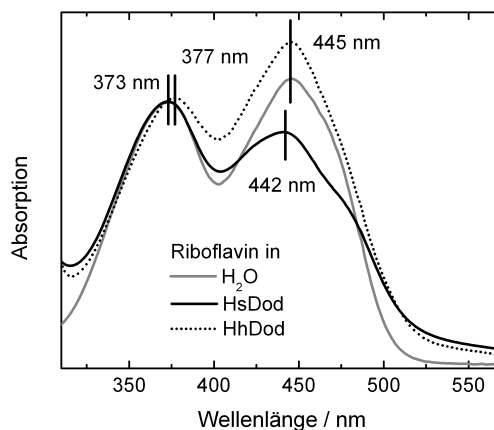


Abbildung 4.49: Statische Absorptionsspektren von Riboflavin in Pufferlösung, bzw. gebunden an HsDod und HhDod.

Transiente Absorptionsspektroskopie im UV/vis

In Abbildung 4.50 ist eine Übersicht der transienten Absorptionsänderungen von Riboflavin eingebaut in HsDod, bzw. HhDod gezeigt. Man sieht deutliche spektrale Unterschiede im Bereich oberhalb von 600 nm, dort reicht das positive Signal bei HhDod weiter in den roten Spektralbereich als für HsDod. Des Weiteren zeigen sich deutliche Unterschiede in der Lebensdauer der Differenzsignale. So besitzt HhDod eine deutlich längere Lebensdauer des positiven Signals oberhalb von 550 nm, sowie eine längere Lebensdauer des negativen Signals unterhalb von 450 nm, das dem Grundzustandsbleichen zugeordnet ist. Noch deutlicher werden die Unterschiede der Signale der beiden Spezies, wenn man die Absorptionsänderungen bei einzelnen Wellenlängen betrachtet, wobei die Daten

mit Hilfe der statischen Spektren anhand der Absorption bei 388 nm normiert wurden (Abbildung 4.51).

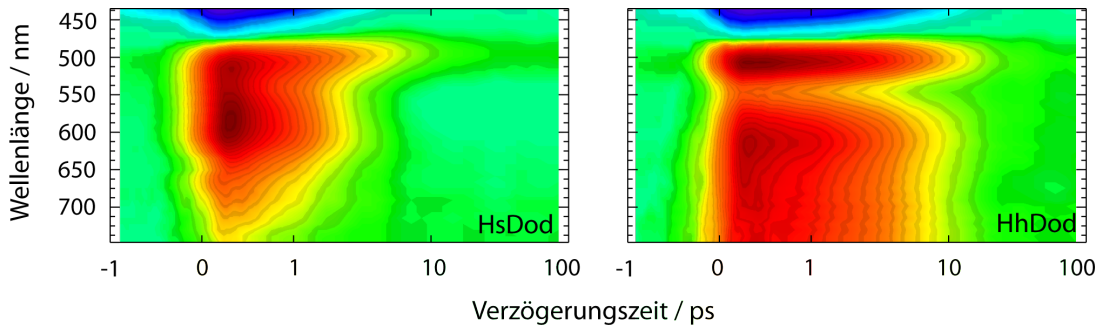


Abbildung 4.50: Transiente Absorptionsänderungen von Riboflavin eingebaut in HsDod (links) und HhDod (rechts) nach einer Photoanregung bei 388 nm.

Im Bereich des Grundzustandsbleichens erkennt man für HhDod- ein ausgeprägteres Signal als für HsDod-gebundenes Riboflavin. Dies ist vermutlich auf die höhere Absorption von HhDod-gebundenem Riboflavin in diesem Spektralbereich zurück zu führen. Deutlich zu erkennen ist auch die unterschiedliche Lebensdauer der negativen Signale. Während das Signal bei HsDod-gebundenem Riboflavin bereits nach etwa 5 ps wieder auf Null zurückgegangen ist, erreicht HhDod-gebundenes erst nach etwa 20 ps wieder den Ausgangszustand. Auch bei 507 nm, in diesem Bereich zeigt Riboflavin in HsDod ein positives Signal mit einer längeren Lebensdauer als in den Bereichen oberhalb von 550 nm, sieht man deutlich die unterschiedliche Lebensdauer der Signale von Riboflavin in archaealem und bakteriellem Dodecin, zumal die Absorptionsänderungen hier direkt nach der Photoanregung in etwa gleich hoch sind. Um 571 nm ist das Signal von HhDod- zwar kleiner, besitzt dafür aber eine deutlich längere Lebensdauer als das Signal von HsDod-gebundenem Riboflavin. Die transiente Absorptionsänderung bei 675 nm zeigt für Riboflavin in HhDod sowohl eine höhere Intensität als auch eine längere Lebensdauer. Mit Hilfe einer globalen Fitanalyse können diese Beobachtungen quantifiziert werden.

Globale Fitanalyse

Die Daten für HhDod-gebundenes Riboflavin konnten erfolgreich durch einen globalen Fit mit vier Zeitkonstanten beschrieben werden. Wie auch beim archaealen Dodecin liegt eine kurze Zeitkonstante τ_1 unterhalb der Zeitauflösung des Experiments und wird daher nicht weiter betrachtet. Weiterhin wurde eine lange Zeitkonstante τ_∞ , deutlich länger als die maximale Verzögerungszeit des Experiments verwendet, um Differenzsignale am Ende des zeitlichen Messbereichs zu beschreiben. Das zerfallenssoziierte Spektrum für diese Zeitkonstante zeigt jedoch keine signifikante Amplitude. Sie wird daher hier nicht weiter betrachtet.

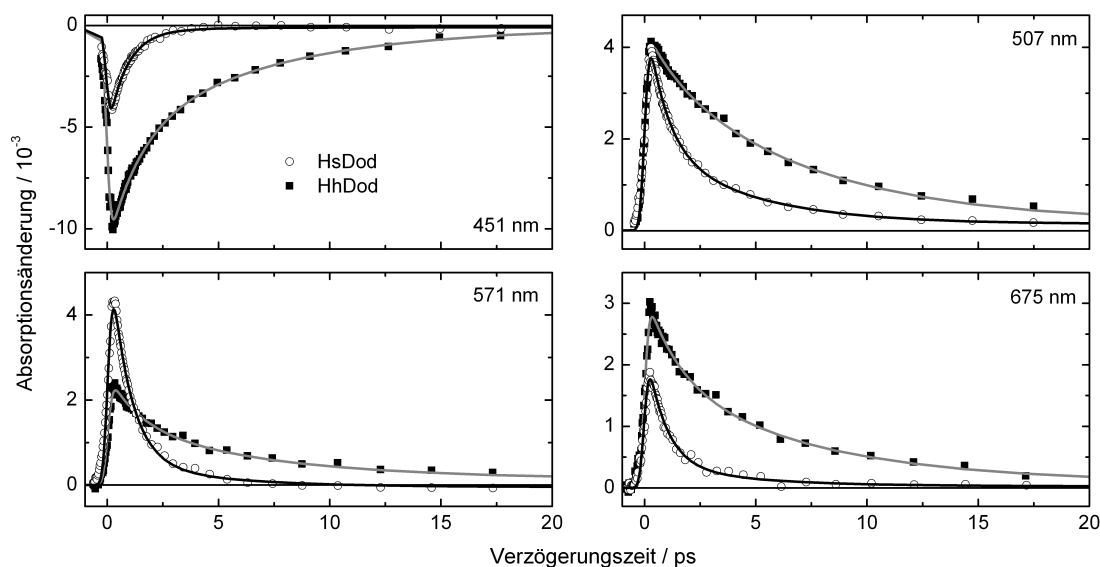


Abbildung 4.51: Transiente Absorptionsänderungen von Riboflavin eingebaut in HsDod und HhDod bei ausgewählten Abtastwellenlängen. Die Spektren von HhDod sind entsprechend ihrer Konzentration auf die Daten von HsDod angepasst. Die Symbole repräsentieren die gemessenen Daten, während die durchgezogenen Linien die Ergebnisse der globalen Fitanalyse wiedergeben.

Die Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 liegen jeweils für HhDod- in der gleichen Größenordnung wie für HsDod-gebundenes Riboflavin, sind jedoch insgesamt etwas länger. Die deutlich längere Lebensdauer und die abweichende spektrale Signatur der Signale von Riboflavin in dem bakteriellen Dodecin lassen sich vor allem mit Hilfe der zerfallassozierten Spektren verstehen (Abbildung 4.52). Diese weisen für τ_3 für beide Dodecin-Proteine eine ähnliche spektrale Signatur auf, mit einem Maximum um 500 nm und vergleichbaren Amplituden (die transienten Daten wurden auf die Absorption in den statischen Spektren normiert). Allerdings sind auch einige Unterschiede zu erkennen: Im Bereich des Grundzustandsbleichens unterhalb von 470 nm weist das zerfallassozierte Spektrum von HhDod- deutlich stärker negative Amplituden auf als das von HsDod-gebundenem

| | HhDod | HsDod |
|-------------------------|---------------|---------------|
| τ_1/ps | <0,15 | <0,15 |
| τ_2/ps | $1,4 \pm 0,3$ | $0,9 \pm 0,2$ |
| τ_3/ps | 7 ± 2 | 4 ± 1 |
| τ_∞/ps | ∞ | ∞ |

Tabelle 4.7: Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse der Daten für HhDod-gebundenes Riboflavin im Vergleich zu HsDod-gebundenem.

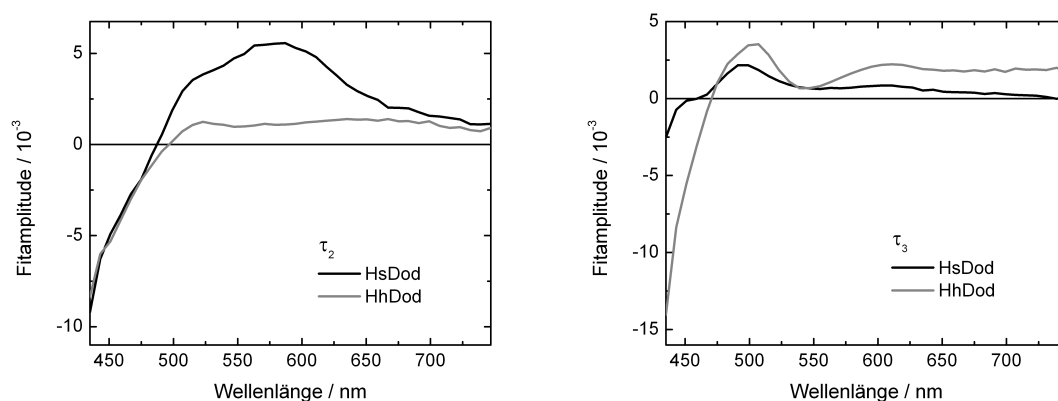


Abbildung 4.52: Zerfallasoziierte Spektren der Zeitkonstanten τ_2 (links) und τ_3 (rechts) von HsDod- und HhDod-gebundenem Riboflavin.

Riboflavin. Oberhalb von 550 nm ist die positive Amplitude im Falle des HhDods höher und strukturlos. Bei 550 nm erkennt man einen Einschnitt, der unter Umständen auf stimulierte Emission des Flavins zurückgeführt werden kann.

Für τ_2 zeigen sich in den zerfallasoziierten Spektren ebenfalls sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen dem archaealen und dem bakteriellen Dodecin. Zwar sind die Amplituden im Bereich des Grundzustandsbleichens sehr ähnlich, jedoch zeigt HhDod-gebundenes Riboflavin im Bereich der positiven Absorptionsänderung zwischen 480 nm und dem roten Ende des Messbereiches (775 nm) eine breite positive, über den gesamten Bereich etwa konstante Amplitude. Die Amplitude von τ_2 für Riboflavin in HsDod hingegen zeigt eine deutlich höhere Amplitude zwischen 475 nm und 775 nm mit einem Maximum um 575 nm. Vergleicht man nun die Amplituden der Zeitkonstanten der jeweiligen Spezies untereinander, so erkennt man, dass bei HhDod die beiden Zeitkonstanten ähnlich hohe Amplituden im Bereich des Grundzustandsbleichens besitzen, also beide etwa gleich stark zur Rückkehr in den Ausgangszustand beitragen. Dahingegen besitzt bei HsDod τ_2 eine deutlich höhere Amplitude als bei HhDod. Allerdings darf nicht direkt von der Amplitude auf die Anzahl der Moleküle in bestimmten Zuständen geschlossen werden, man muss noch die Absorptionsspektren der jeweils beteiligten Spezies berücksichtigen.

Diskussion

Die Ergebnisse für die transienten Messungen an HsDod- und HhDod-gebundenem Riboflavin zeigen zunächst beide eine schnelle Rückkehr in den anfänglichen Grundzustand. Bei näherer Betrachtung zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede, sowohl in der spektralen als auch in der transienten Charakteristik. So sind die Zeitkonstanten für HhDod etwas länger als für HsDod. Längere Zeitkonstanten können damit erklärt werden, dass der Überlapp der π -Systeme in der aromatischen Tetrade im Falle des HhDods geringer

und damit ein Elektronentransfer/-rücktransfer langsamer abläuft. Die unterschiedlichen spektralen Signaturen der zerfallassozierten Spektren der τ_2 -Zeitkonstante weisen darauf hin, dass verschiedene Intermediate beteiligt sind. Für HsDod wurde für die schnelle Zeitkonstante τ_2 der Elektronenrücktransfer vom Riboflavin auf den Tryptophanrest diskutiert, der, aufgrund der Abhängigkeit der Zeitkonstante von einer Deuterierung des Lösungsmittels, mit einem Protonentransferprozess verknüpft ist. Dieser Reaktionspfad scheint für HhDod eine deutlich geringere bzw. keine Relevanz zu besitzen. Die Zeitkonstante τ_2 muss hier einem anderen Prozess zugeordnet werden. Zudem ist sie im Falle des HhDods deutlich länger als für HsDod.

Die spektrale Ähnlichkeit der zerfallassozierten Spektren der τ_3 -Zeitkonstanten deutet an, dass hier der gleiche Reaktionspfad in beiden Proben zu einer Löschung des angeregten Zustands führt. Die stärker negative Amplitude unterhalb von 475 nm basiert vermutlich auf den Unterschieden in den statischen Absorptionsspektren (vergleiche hierzu Abbildung 4.49). Die breite Absorption oberhalb von 550 nm und das lokale Minimum bei etwa 540 nm könnten ein Hinweis auf Riboflavin im ersten angeregten Zustand (S_1) sein.

Die abweichende Dynamik spiegelt die strukturellen Unterschiede der beiden Bindetaschen wider (siehe hierzu Abbildung 4.5): Die Anordnung der Flavine in den Bindetaschen von HsDod und HhDod ist verschieden, *re-re* in HsDod und *si-si* in HhDod, und die Ausrichtung der aromatischen Tetrade ist im Fall des bakteriellen Dodecins so, dass die π -Systeme schlechter überlappen. Außerdem befinden sich unterhalb der HhDod-Bindetasche nicht so viele koordinierte Wassermoleküle wie im Fall des HhDod und auch kein wasserkoordiniertes Magnesiumion. Stattdessen bildet ein Argininrest in der HhDod-Bindetasche eine Wasserstoffbrücke zu der N5-Position des Isoalloxazinsystems aus. Weiterhin unterscheiden sich die Bindetaschen von HsDod und HhDod durch die Anordnung weiterer Aminosäurereste, deren Rolle im einzelnen jedoch im Zuge weiterer Experimente an mutierten Dodecinproteinen untersucht werden muss. In HhDod wird beispielsweise die Ribitylkette durch ein Histidin und ein Tyrosin stabilisiert, während diese Aufgabe in HsDod ein Valin und eine Glutaminsäure übernehmen. Zudem stabilisiert in HsDod ein Glutamin die Position des Isoalloxazins in der Bindetasche durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu N3 und einem Sauerstoff.

Insgesamt deuten die Unterschiede in den Ergebnissen der transienten Absorptionsmessungen von HsDod und HhDod an, dass HhDod trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu HsDod eine andere Aufgabe erfüllt. Während HsDod unerwünschte Reaktionen von Riboflavin verhindern soll und gleichzeitig zelltoxisches Lumichrom bindet, ist die Funktion des bakteriellen Dodecins als Binder von FMN noch nicht ganz verstanden. Die schnellere und effektivere Wiederbesetzung des anfänglichen Grundzustands in HsDod legt nahe, dass es sich bei HhDod nicht um einen Molekül, ausschließlich zum Schutz des FMNs vor ungewollten Reaktionen nach Photoanregung handelt. Die Eigenschaft von NADH:FMN-Oxidoreduktase (EmoB) ebenfalls FMN-Dimere binden zu können [114], regt Spekulationen über HsDod als möglichen Lieferanten von $FADH_2$ für Redoxreaktionen in Partnerproteinen an. Für Dodecin aus *Thermus thermophilus* konnte gezeigt werden, dass es auch Coenzym A in seine Bindetaschen einbauen kann [103]. Dies

deutet wiederum darauf hin, dass bakterielles Dodecin als bifunktionales Speicherprotein fungieren könnte.

4.5 Fazit

Dodecin aus *Halobacterium salinarum* ist ein Riboflavin bindendes Protein, das unerwünschte Reaktionen von Riboflavin nach Photoanregung verhindert und es für die Biosynthese von FAD und FMN bereitstellt. Die kurzzeitspektroskopischen Untersuchungen an HsDod-gebundenem Riboflavin zeigten, dass diese Funktion dadurch gewährleistet wird, dass der reaktive angeregte Zustand des Flavins schneller als 150 fs entvölkert wird. Des Weiteren gelangt das Riboflavinmolekül bereits nach etwa 10 ps wieder in den Ausgangszustand zurück.

Untersuchungen an HsDod-Proteinen, deren Bindetaschen mit dem kleineren Lumiflavin besetzt sind, zeigten, dass die Ribitylkette des Riboflavins keinerlei Einfluss auf den Auslöschungsmechanismus besitzt. Zudem konnte mit Hilfe dieser Proben gezeigt werden, dass der Einbau der kleineren Flavine in einer leicht veränderten Position im Vergleich zum Riboflavin nicht zu einer veränderten Dynamik führt.

Mit Hilfe von HsDod, das mit FAD in seiner geschlossenen Form besetzt ist, wobei der Adeninrest die zweite Position in der Bindetasche besetzt, konnte gezeigt werden, dass das zweite Flavin in der Bindetasche nicht zur Entvölkerung des angeregten Zustands des Flavins und zur Wiederbesetzung des Ausgangszustands beiträgt. Außerdem wurde gezeigt, dass das nicht angeregte Flavin in der Bindetasche keinen Beitrag zu den Differenzsignalen liefert. Das Binden von zwei Flavinen dient somit der Optimierung der Flavinbeladung des Proteins.

Experimente an HsDod-Proteinen, die mit Lumichrom besetzt sind, zeigten, dass der photoangeregte Zustand von Lumichrom ebenfalls sehr schnell entvölkert und der Ausgangszustand schnell wiedererlangt wird. Daher wird für Lumichrom ein ähnlicher Mechanismus wie für Riboflavin vermutet. Ob dies eine Relevanz für die biologische Funktion des HsDods besitzt muss noch geklärt werden.

Untersuchungen an HsDod-Proben, die Riboflavin und Lumichrom enthielten, zeigten keine eindeutigen Ergebnisse, allerdings müssen hier auch neben den heterogen besetzten Bindetaschen die homogen besetzten berücksichtigt werden, was eine exakte Auswertung der Daten sehr kompliziert macht. Eine eindeutige Aufklärung der Funktion von HsDod, beide Cofaktoren *in vivo* einzubauen, steht noch aus.

Mit Hilfe von HsDod-gebundenem Riboflavin in deuterierter Pufferlösung konnte gezeigt werden, dass ein Protonentransfer Teil des Auslöschungsmechanismus ist. Mittels der mutierten Proben D41S- und D41E-HsDod konnte die Beteiligung eines wasserkoordinierten Magnesiumions unterhalb der Bindetasche jedoch ausgeschlossen werden.

Aufgrund von Beobachtungen an anderen Flavoproteinen wird ein Elektronentransfer von einem Tryptophanrest auf das photoangeregte Flavin als zentraler Schritt für die Entvölkerung des angeregten Zustands angenommen. Diese Theorie wird gestützt durch die positive Absorptionsänderung um 550 nm-600 nm, die der Absorption eines

kationischen Tryptophanradikals entspricht. Die Ergebnisse für HsDod-Proteine mit modifizierten Tryptophanresten untermauern diese Vermutung, da ihre unterschiedlichen Ionisierungsenergien die Lebensdauer der Differenzsignale erheblich beeinflussen. Sowohl für die Zeitkonstante τ_2 als auch für τ_3 konnte eine Abhängigkeit von dem Tryptophanrest festgestellt werden. Auf den ersten Blick scheint die Auswahl des Tryptophan-Derivats keinen Einfluss das positive Signal um 500 nm zu nehmen. Jedoch weisen die unterschiedlichen Zeitkonstanten τ_3 , die den Zerfall des Signals bei dieser Wellenlänge beschreiben, darauf hin, dass auch für den Prozess, der mit dieser Zeitkonstante beschrieben wird, von dem Tryptophanrest abhängig ist.

Aufgrund der Ergebnisse der transienten spektroskopischen Untersuchungen an HsDod können über den Mechanismus, der zur Entvölkerung des reaktiven angeregten Zustands des Riboflavins und somit dem Schutz vor Photodegradierung führt, folgende Aussagen getroffen werden: Bei Photoanregung des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs gelangt das angeregte Flavin innerhalb von weniger als 150 fs (schneller als die Zeitauflösung der verwendeten Experimente) über interne Konversion in den ersten angeregten Zustand (S_1). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass zwei unterschiedliche Zustände, die verschiedene Absorptionsspektren besitzen, mit den beiden Zeitkonstanten τ_2 und τ_3 zerfallen und zu einer Rückkehr in den Ausgangszustand führen. Auf der Grundlage der vorhandenen Daten konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um einen parallelen oder sequentiellen Mechanismus handelt. Für ein besseres Verständnis sind beide Möglichkeiten in Abbildung 4.53 schematisch dargestellt.

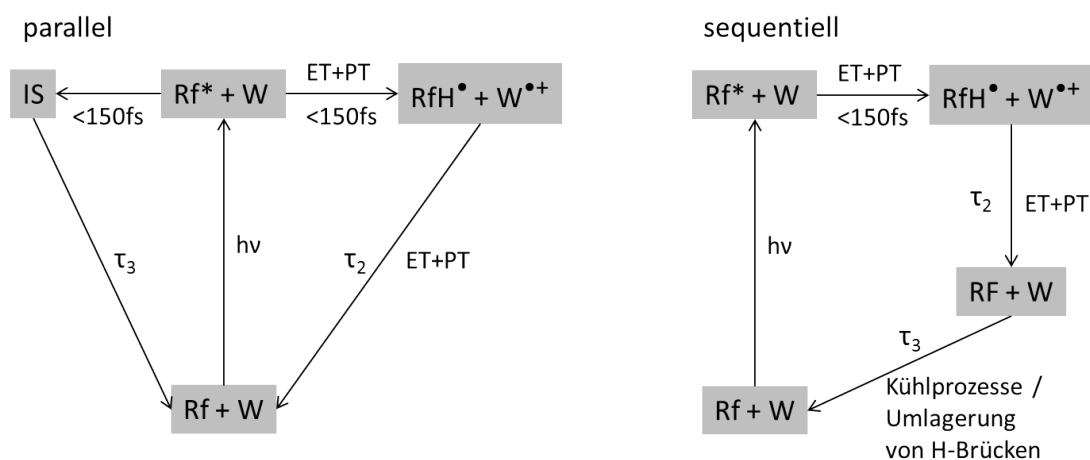


Abbildung 4.53: Schematische Darstellung der möglichen Lösungsmechanismen von Riboflavin in HsDod nach Photoanregung. Links ist der parallele, rechts ein möglicher sequentieller Mechanismus gezeigt. Abkürzungserläuterung: Rf: Riboflavin, W: Tryptophan, ET: Elektronentransfer, PT: Protonentransfer, IS: Zwischenprodukt

Beim parallelen Mechanismus kann der S_1 -Zustand des Riboflavins im HsDod-Protein auf zwei unterschiedlichen Wegen entvölkert werden. An dem schnelleren Mechanismus ist vermutlich ein kationisches Tryptophanradikal beteiligt. Dies deuten die positiven Differenzsignale um 550 nm-600 nm an. Außerdem spielt hierbei ein Protonentransfer eine Rolle, wahrscheinlich von einem Lösungsmittelmolekül auf das Flavin. Dies zeigen die Ergebnisse für HsDod-gebundenes Riboflavin in deuteriertem Lösungsmittel. Ein Elektronentransfer von einem Tryptophanrest in der Bindetasche auf das photoangeregte Flavin, der mit einem Protonentransfer gekoppelt ist, innerhalb der Zeitauflösung des Experiments und der Rücktransfer mit einer Zeitkonstanten τ_2 von 700 fs bis 900 fs führt zu der schnellen Wiederbesetzung des Ausgangszustands. Auch der erste Schritt des zweiten Mechanismus findet innerhalb der Zeitauflösung statt. Anschließend zerfällt das dabei entstandene Zwischenprodukt (IS) mit der Zeitkonstante τ_3 zurück in den Ausgangszustand.

Bei einem sequentiellen Mechanismus wird ebenfalls der S_1 -Zustand des Riboflavins schnell entvölkert. Analog zum parallelen Mechanismus entsteht durch Elektronentransfer von einem Tryptophanrest auf das Flavin ein kationisches Tryptophanradikal. Dieser Vorgang könnte an einen Protonentransfer von umgebenden Lösungsmittelmolekülen gekoppelt sein und zu einem neutralen Riboflavinsemichinon führen. Dieser Zustand zerfällt mit der Zeitkonstante τ_2 , wobei das Elektron zurücktransferiert wird. An diesem Schritt ist nach den Ergebnissen für die deuterierten Proben ein Protonentransfer beteiligt. Dieses Zwischenprodukt zerfällt mit einer Zeitkonstanten τ_3 und führt zur Wiederbesetzung des Ausgangszustands. Die spektrale Signatur des zerfallassozierten Spektrums von τ_3 gibt Hinweise darauf, dass es sich bei dem Zwischenprodukt um ein schwingungsangeregtes Riboflavin oder ein Riboflavin mit veränderter Wasserstoffbrückenanordnung handeln könnte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen eher auf einen parallelen Mechanismus hin, ein sequentieller Mechanismus kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die Identität des Zwischenprodukts, das mit τ_3 zerfällt, konnte noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Die Daten an den HsDod-Proben mit Tryptophan-Derivaten legen nahe, dass bei dieser Zeitkonstante ein Elektronentransfer vom Tryptophan auf das Flavin eventuell auch eine Rolle spielt. Darauf weisen die unterschiedlichen Zeitkonstanten für τ_3 für die verschiedenen HsDod-Analoga hin. Allerdings zeigen die zerfallassozierten Spektren sehr ähnliche spektrale Signaturen und deuten an, dass das Tryptophan in dem betrachteten Spektralbereich nicht zu den Signalen beiträgt, die mit τ_3 zerfallen. Eine Beteiligung des zweiten Flavins, der Ribitylkette sowie des wasserkoordinierten Magnesiumions können ausgeschlossen werden. Die spektrale Signatur der zerfallassozierten Spektren könnte von einem neutralen Tryptophanradikal oder einem anionischen Riboflavinradikal verursacht werden [138–143]. Ein neutrales Tryptophan-Derivat könnte z. B. durch einen Protonentransfer vom Tryptophan auf E38 des HsDods erzeugt werden. Die spektrale Signatur des zerfallassozierten Spektrums könnte auch auf eine insgesamt bathochrom verschobene Absorption des Riboflavins hinweisen. Dies könnte beispielsweise durch veränderte Wasserstoffbrücken in der Bindetasche zu Stande kommen. Weiterhin

könnten bathochrom verschobene Absorptionsbanden auf schwingungsangeregte Riboflavinmoleküle hindeuten und mit τ_3 somit Kühlprozesse beschrieben werden. Die spektrale Signatur entspricht dem Differenzspektrum einer bathochromen Verschiebung der Absorptionsbande. Hierfür käme ein schwingungsangeregtes Riboflavinmolekül in seiner oxidierten Form im elektronischen Grundzustand in Frage. Sowohl oxidiertes Riboflavin im ersten elektronisch angeregten Zustand als auch Riboflavinsemichinon weisen deutlich abweichende Absorptionsspektren auf, weshalb das beobachtete Signal bei 550 nm nicht auf Kühlprozesse dieser Spezies zurückzuführen ist. Voraussetzung dafür, dass τ_3 einen Kühlprozess eines oxidierten Riboflavins im Grundzustand beschreibt, wäre jedoch ein sequentieller Mechanismus. Der entsprechende Prozess ist in Abbildung 4.54 schematisch dargestellt. Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse an 4-Amino-W-HsDod Hinweise auf die Beteiligung einer weiteren Spezies liefert. Alternativ kann diese Zeitkonstante ebenfalls Kühlprozessen zugeordnet werden. Hier könnten zusätzliche Studien mit kurzwelligerem Abtastweißlicht weiteren Aufschluss geben. Voraussetzung ist hierbei jedoch eine sehr stabile Einstellung des CaF₂-Weißlichts und des Anregungslichts.

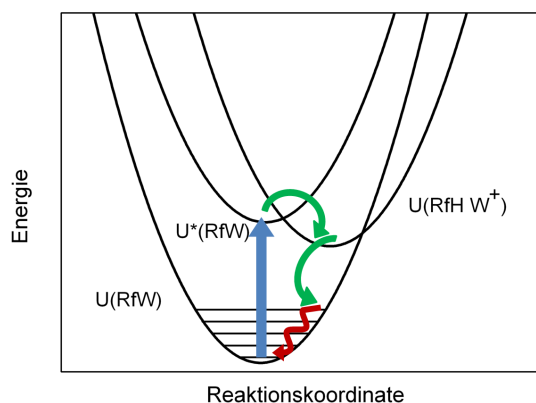


Abbildung 4.54: Schematische Darstellung eines Mechanismus, der zunächst durch Elektronen- und Protonentransferprozesse zur Entvölkerung des angeregten Zustands des Riboflavins führt, gefolgt von Elektronen- und Protonenrücktransfer und anschließenden Kühlprozessen. Die Photoanregung ist durch einen blauen Pfeil symbolisiert, Elektronen- und Protonentransfer mit grünen Pfeilen und Kühlprozesse durch einen roten.

Anhand der Proben mit eingebauten Tryptophan-Derivaten konnte zudem gezeigt werden, welches Potential der Einbau modifizierter Aminosäuren für die Steuerung einiger Prozesse in Proteinen besitzt. In HsDod konnte die Geschwindigkeit eines Elektronentransfers durch die Verwendung von Tryptophan-Derivaten mit unterschiedlichen Ionisierungsenergien verändert werden.

Die Ergebnisse für HhDod-gebundenes Riboflavin zeigen spektrale und kinetische Unterschiede zu den Ergebnissen für HsDod. So spiegeln die längeren Lebensdauern der Differenzsignale die unterschiedliche Anordnung der Flavine in der Bindetasche wider. In HhDod ist die $\pi\pi$ -Wechselwirkung zwischen dem Tryptophan und dem gebundenen

Flavin deutlich weniger ausgeprägt als im Falle des HsDod. Des Weiteren spielen bei dem schnelleren der beiden Reaktionskanäle, die zur Entvölkerung des angeregten Zustands des Flavins führen, unterschiedliche Zwischenprodukte eine Rolle. Diese deutlichen Unterschiede zwischen HsDod und HhDod deuten an, dass Dodecin-Proteine, trotz der großen sequenziellen und strukturellen Ähnlichkeiten, unterschiedliche Aufgaben in der Zelle besitzen. Diese Annahme wird dadurch verstärkt, dass die beiden Dodecine *in vivo* unterschiedliche Cofaktoren binden. Während HsDod Riboflavin und Lumichrom in seinen Bindetaschen einbaut, ist HhDod ein Bindeprotein für FMN.

Weitere Untersuchungen an HhDod mit ähnlichen Ansätzen wie für das archaeale Dodecin können zum besseren Verständnis der Aufgabe des bakteriellen Dodecins beitragen. So kann z. B. die Beteiligung von Protonen am Auslöschungsmechanismus mit Hilfe von deuterierten Lösungsmitteln untersucht werden. Mit Hilfe von FMN besetzten Bindetaschen kann überprüft werden, ob für den natürlichen Cofaktor ein anderes Verhalten beobachtet werden kann, als für mit Riboflavin besetzte Bindetaschen. Durch gezielte Mutationen können verschiedene Aminosäurereste hinsichtlich ihrer Rolle für den Mechanismus untersucht werden. Besonderes Augenmerk ist hier auf Tyrosin- und mehrere Histidinreste zu legen, die rund um die Bindetasche angeordnet sind. Außerdem bietet die weniger effiziente Fluoreszenzlöschung die Möglichkeit, die Lebensdauer des angeregten Flavins mittels transientser Fluoreszenzspektroskopie zu untersuchen. Wichtig ist hierbei eine hohe Zeitauflösung und eine sehr empfindliche Detektion, da die transienten Daten nahe legen, dass die Fluoreszenz nur schwach und sehr kurzlebig ist. Derzeit befindet sich in der Arbeitsgruppe ein Kerr-Schalter-Aufbau in der Testphase, mit dem solche Untersuchungen möglich sein sollten.

5 Azopeptide

5.1 Einführung

5.1.1 Erste Schritte der Proteinfaltung

Die einzelnen Prozesse der Faltung eines Proteins hin zu seiner funktionsfähigen, nativen Form laufen auf unterschiedlichen Zeitskalen ab. So finden erste Kontaktbildungen zwischen zwei Aminosäuren einer Polypeptidkette in Random-Coil-Struktur bereits auf einer Zeitskala von einigen Nanosekunden statt [165]. Die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen wie α -Helices oder β -Faltblattstrukturen benötigt etwa hundert Nanoskunden bis zu einigen Mikrosekunden [166, 167]. Je nach Länge und Struktur geschieht der komplette Faltungsvorgang natürlicher Proteine von der Random-Coil-Struktur bis zu ihrer nativen Form im Zeitbereich von weniger als einer Millisekunde bis hin zu einigen Stunden [167]. Ähnliche Zeitskalen werden auch für die Umstrukturierung von Proteinen erwartet.

Die Proteinfaltung beginnt jedoch nicht erst mit der Kontaktbildung zwischen einzelnen Aminosäuren, sondern bereits mit den ersten Bewegungen einzelner Aminosäurereste und des Peptidrückgrats, wie beispielsweise einzelne Rotationsbewegungen und Änderungen der Diederwinkel. Diese Prozesse finden auf der Zeitskala von einigen zehn Pikosekunden statt [168]. Noch schneller laufen Molekülschwingungen (10 fs bis 10 ps), Molekülrotationen (100 fs bis 1 ns) und Elektronenbewegungen (100 as bis 10 fs) ab [169].

Um die initialen Faltungsschritte untersuchen zu können, muss dem Polypeptid eine Art von Startsignal gegeben werden. In der Anreg-Abtast-Spektroskopie, mit der Zeitaufösungen bis in den Femtosekundenbereich möglich sind (siehe Kapitel 2.2), dient hierzu ein Lichtpuls. Eine Möglichkeit dieses Signal auf das Peptid zu übertragen, ist der Einbau eines Photoschalters in das Peptidrückgrat. In den folgenden Abschnitten wird zunächst die biologische Vorlage für die betrachteten Azopeptide Thioredoxinreduktase (TrxR) und der Photoschalter Azobenzol vorgestellt. Anschließend wird die Entwicklung eines kurzen Modellpeptids gezeigt, das auf dem aktiven Zentrum der TrxR basiert und ein Azobenzol als Photoschalter enthält.

5.1.2 Das Flavoprotein Thioredoxinreduktase

Bei Thioredoxin (Trx) handelt es sich um ein 12 kDa schweres Enzym, das die Redox-Umgebung in der Zelle kontrolliert [171]. Es kommt in allen bekannten Organismen vom einfachen Bakterium bis hin zum Menschen stets in der gleichen Form vor. Thioredoxinreduktase (TrxR) besitzt, wie der Name bereits andeutet, die Fähigkeit die

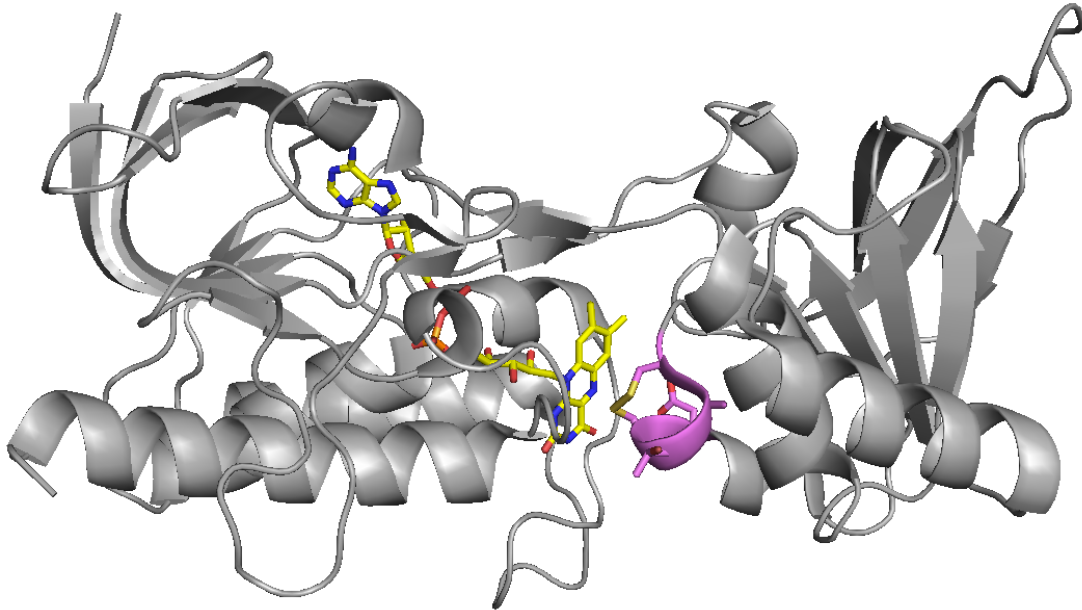


Abbildung 5.1: Thioredoxinreduktase aus *Escherichia coli* in seiner FO-Form. Das aktive Zentrum mit der Aminosäuresequenz CATCA ist violett markiert und die entsprechenden Seitenketten dargestellt. Das FAD-Molekül ist in gelb dargestellt. Für die Umwandlung in die FR-Form muss sich die NADPH-Domäne (rechts, enthält das aktive Zentrum) um etwa 66° gegen die FAD-Domäne (links) verdrehen. Die atomaren Koordinaten wurden PDB entnommen (www.wwpdb.org, PDB ID: 1TDE [170]).

oxidierte Form des Trx zu reduzieren. TrxR gehört zu der Familie der Flavoproteine und katalysiert den Transfer von Elektronen von NADPH auf Thioredoxin mit Hilfe von FAD und einem redoxaktiven Disulfid im aktiven Zentrum [88, 89]. TrxR kommt in den unterschiedlichen Organismen in verschiedenen Formen vor. Man unterscheidet grob zwischen *low molecular weight* Thioredoxinreduktase (L-TrxR) mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, die beispielsweise in Bakterien und Pilzen vorkommt, und *high molecular weight* Thioredoxinreduktase (H-TrxR) mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, die man unter anderem in Tieren und Menschen findet. Neben den unterschiedlichen Größen der L-TrxR und H-TrxR finden sich noch weitere Unterscheidungsmerkmale. So weisen die L-TrxR in ihrem aktiven Zentrum stets die Aminosäuresequenz CXXC auf (wobei X ein Platzhalter für beliebige Aminosäuren ist), während H-TrxR immer die Sequenz CXXXXC besitzen. In Abbildung 5.1 ist TrxR aus *Escherichia coli* gezeigt.

TrxR kann in zwei unterschiedlichen Konformationen auftreten: Der FR- (von **F**lavinreduktion) und der FO-Form (von **F**lavinoxidation). Beide sind wichtig für die vollständige Übertragung der Elektronen vom NADPH auf Trx. Während in der FR-Konformation die Reduktion des FADs durch NADPH sowie die Reduktion des Trx-Substrats durch das Dithiol der TrxR stattfindet, ist die FO-Konformation notwendig für die Oxidation

des FADs durch das Disulfid des Proteins [172]. Für den Übergang aus der FO- in die FR-Form muss sich die NADPH-Domäne etwa 66° gegen die FAD-Domäne verdrehen [89].

5.1.3 Der Photoschalter Azobenzol

Azobenzol wurde erstmals 1832 von Mitscherlich durch die Reduktion von Nitrobenzol in alkalischer Lösung synthetisiert [1, 173]. Hartley konnte 1937 die Existenz von zwei Isomeren des Azobenzols, der *cis* und der *trans*-Form, nachweisen [174]. Er stellte fest, dass sich die *trans*-Form des Azobenzols durch Belichtung mit Sonnenlicht in die *cis*-Form überführen ließ und sich die beiden Isomere in ihrer Farbe, der Löslichkeit und dem Dipolmoment unterscheiden.

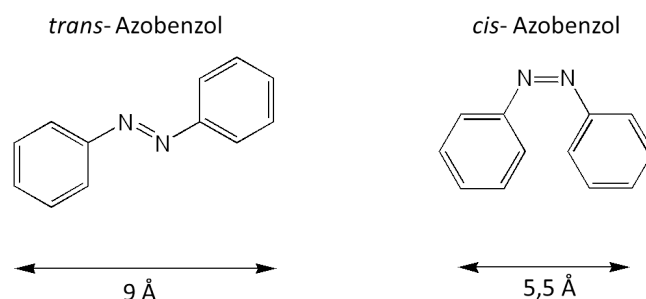


Abbildung 5.2: Vereinfachte Strukturen von Azobenzol in seiner *trans*- seiner *cis*-Konformation. Der End-zu-End-Abstand beträgt im *trans*-Azobenzol etwa 9,0 Å, während er im *cis*-Azobenzol nur etwa 5,5 Å groß ist.

Abbildung 5.2 zeigt die beiden Isomere des Azobenzols in vereinfachter Form. Über die genaue Struktur der *trans*- und der *cis*-Form des Azobenzols herrscht in der Literatur keine einhellige Meinung. So wird *trans*-Azobenzol entweder planar mit C_{2h} -Symmetrie beschrieben [175] oder die Phenylringe sind um 30° gegen die N=N-C-Ebene verkippert, so dass sich bei Verkippung der Phenylringe in die gleiche Richtung eine C_2 -Symmetrie ergibt oder eine C_i -Symmetrie bei Verkippung in entgegengesetzte Richtungen [176]. In der *cis*-Form beträgt die Verkippung zwischen 50° und 60° und die Symmetrie wird entweder als C_{2v} [175] oder C_2 [177] angegeben. Der End-zu-End-Abstand ist in den beiden Isomeren unterschiedlich. Im *trans*-Isomer beträgt er 9,0 Å, während er im *cis*-Isomer lediglich 5,5 Å misst. Diese Eigenschaft spielt für die Verwendung von Azobenzol als Photoschalter in den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden eine zentrale Rolle.

Photochemie des Azobenzols

Die *trans*-Konfiguration des Azobenzols ist aus sterischen Gründen energetisch begünstigt. Daher kann auf thermischem Weg reines *trans*-Azobenzol erhalten werden. Die Geschwindigkeit der thermischen Rückisomerisierung aus der *cis*- in die *trans*-Form liegt

| | $\pi\pi^*$ | | $n\pi^*$ | |
|--------------|------------------------|--|-------------------------|--|
| | λ_{max} /nm | ϵ / $\frac{l}{mol \cdot cm}$ | λ_{max} / nm | ϵ / $\frac{l}{mol \cdot cm}$ |
| <i>trans</i> | 320 | 23000 | 435 | 400 |
| <i>cis</i> | 290 | 5000 | 435 | 1250 |

Tabelle 5.1: Absorptionsdaten von Azobenzol in DMSO mit Absorptionsmaxima λ_{max} und Extinktionskoeffizienten ϵ für die *trans*- und die *cis*-Form. Entnommen aus [178].

bei Raumtemperatur im Bereich von Stunden bis Tagen. Die Absorptionsspektren von *trans*- und *cis*-Azobenzol sind in Abbildung 5.3 gezeigt und die Absorptionsdaten in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

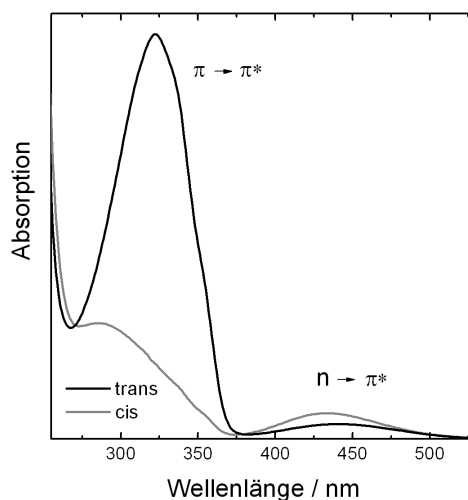


Abbildung 5.3: Absorptionsspektrum von *trans*- und *cis*-Azobenzol in DMSO. Das Spektrum der *trans*-Form wurde im thermischen Gleichgewicht aufgenommen, die *cis*-Form wurde durch Belichtung bei 365 nm erzeugt (vergleiche Abbildung 2.7).

Die schwache, unstrukturierte Bande bei 435 nm wird dem $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang ($n\pi^*$) zugeordnet. Sie ist für das *cis*-Isomer deutlich ausgeprägter, was auf die Auswahlregeln für optische Übergänge und die Molekülsymmetrien von *cis*- und *trans*-Form des Azobenzols zurückzuführen ist [175, 179]. Die deutlich intensivere Absorptionsbande des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs ($\pi\pi^*$) liegt für das *trans*-Isomer bei 320 nm, für das *cis*-Isomer bei 290 nm. Für diesen Übergang ist das Überlappungsintegral aus der Wellenfunktionen des Grund- und des angeregten Zustands deutlich größer als für den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang. Dies führt zu der deutlich stärkeren Absorption im Bereich des $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergangs. Die Fluoreszenzquantenausbeute sowie die Wahrscheinlichkeit für Triplettübergänge sind

| Lösungsmittel | $\Phi_{trans \rightarrow cis}$ | | $\Phi_{cis \rightarrow trans}$ | |
|----------------------|--------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| | $n\pi^*$ | $\pi\pi^*$ | $n\pi^*$ | $\pi\pi^*$ |
| n-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 5.2: Isomerisierungsquantenausbeuten für Azobenzol in unterschiedlichen Lösemitteln bei unterschiedlichen Anregungsenergien. Der $n\pi^*$ -Übergang wurde bei 439 nm, der $\pi\pi^*$ -Übergang bei 317 nm angeregt [181].

sehr gering und werden daher vernachlässigt [180, 181]. Stattdessen wird der elektronisch angeregte Zustand effizient und schnell durch interne Konversion in den Grundzustand überführt, wobei mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das jeweils andere Isomer gebildet wird. Die Isomerisierungsquantenausbeute Φ_I ist definiert als:

$$\Phi_I = \frac{\text{Anzahl der Photonen, die zur Isomerisierung führen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} \quad (5.1)$$

Im Falle des Azobenzols ist sie abhängig vom Lösungsmittel und der Anregungsenergie. In Tabelle 5.2 sind die Isomerisierungsquantenausbeuten für Azobenzol ($trans \rightarrow cis$ und $cis \rightarrow trans$) in unterschiedlichen Lösungsmitteln für verschiedene Anregungsenergien zusammengefasst. Im Allgemeinen ist die Quantenausbeute der $cis \rightarrow trans$ -Isomerisierung deutlich größer als die der $trans \rightarrow cis$ -Isomerisierung. Die Abhängigkeit der Isomerisierungsquantenausbeute von der Anregungsenergie weist auf unterschiedliche Reaktionspfade hin. Obwohl sich Kashas Regel für gewöhnlich auf Fluoreszenzprozesse bezieht spricht man hier häufig in Analogie dazu von einer „Verletzung der Regel von Kasha“ [19, 182].

Aus Tabelle 5.2 wird deutlich, dass durch Auswahl der Anregungswellenlänge das Gleichgewicht zwischen $trans$ - und cis -Form verschoben werden kann. Man kann also durch Belichtung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge zwischen beiden isomeren Formen hin und her schalten. Allerdings kann auch durch kontinuierliche Belichtung kein reines cis - oder $trans$ -Azobenzol erzeugt werden, sondern man erhält stets ein photostationäres Gleichgewicht. Voraussetzung hierfür ist, dass die thermische Rückreaktion nur langsam abläuft. Die Lage des photostationären Gleichgewichts kann durch die Auswahl von Lösungsmittel, Temperatur, Substitution des Azobenzols und eingestrahelter Wellenlänge variiert werden.

Isomerisierungsmechanismus des Azobenzols

Für die Isomerisierung des Azobenzols wurden in der Vergangenheit verschiedene Mechanismen diskutiert. Ein Reaktionsmechanismus muss die experimentell gefundenen

Ergebnisse erklären und darf ihnen nicht widersprechen. Im Falle der Azobenzolisomerisierung erwartet man aufgrund der Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade (bei 24 Atomen ergeben sich $3N-6 = 66$ Freiheitsgrade) einen recht komplexen Ablauf der Geometrieänderung. Durch eine Reduzierung auf die Betrachtung der wichtigsten Freiheitsgrade, können jedoch drei potentielle Reaktionsmechanismen herausgearbeitet werden, die in Abbildung 5.4 dargestellt sind und im Folgenden vorgestellt werden.

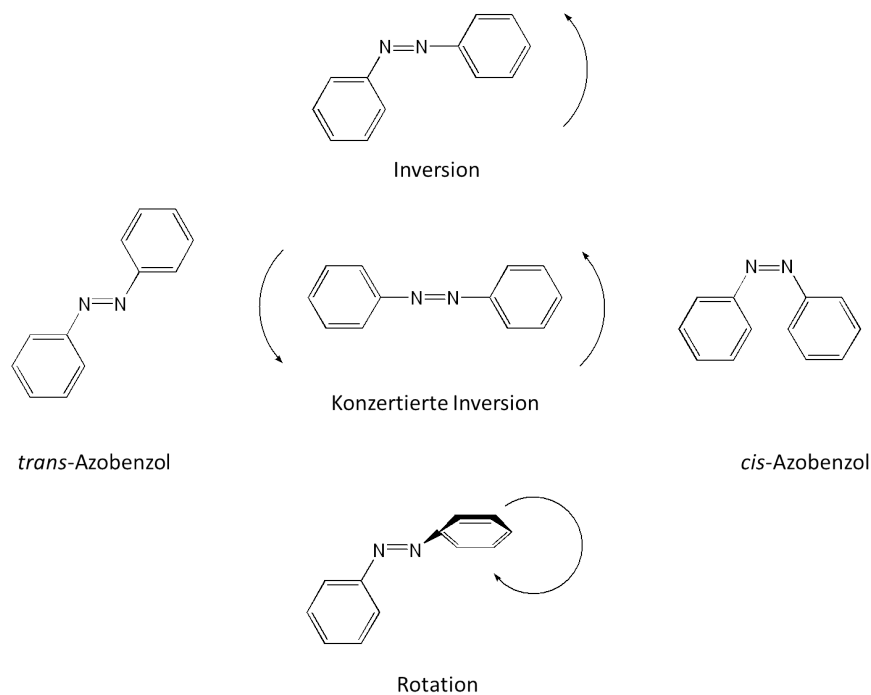


Abbildung 5.4: Mögliche Reaktionspfade der Azobenzolisomerisierung: Inversion, konzertierte Inversion und Rotation.

- *Inversions-Mechanismus*
Ein Phenylring bewegt sich in der Ebene, die durch die N=N-C-Bindung aufgespannt wird. Über einen semi-linearen Übergangszustand schwingt der Phenylring bis der jeweils andere isomere Zustand erreicht ist. Da die *cis*-Form nicht planar ist müssen gleichzeitig noch andere Änderungen der Geometrie stattfinden [183].
- *Konzertierter Inversions-Mechanismus*
Beide Phenylringe ‘schwingen‘ in der N=N-C-Ebene. Über einen linearen Übergangszustand, bei dem zwischenzeitlich der Doppelbindungscharakter der Azo-gruppe aufgehoben wird, gelangt das Molekül schließlich in die jeweils andere Konformation [184].

- *Rotations-Mechanismus*

Einer der Phenylringe rotiert um die N=N-Bindung. Im Übergangszustand stehen die beiden Phenylringe senkrecht zueinander. Dieser Mechanismus ist mit einer großen Bewegung des Phenylrestes durch das Lösemittel verbunden [183].

Es handelt sich hier um stark vereinfachte Modellvorstellungen. Daneben wurden auch komplexere Mechanismen vorgeschlagen, wie beispielsweise der *Hula-Twist-Mechanismus*, der auch für die Photoisomerisierung von Stilben [185] oder Provitamin D [186] diskutiert wurde. Hierbei bewegt sich nach Photoanregung ein Stickstoffatom aus der Molekülebene heraus und ermöglicht so die Inversionsbewegung des benachbarten Phenylrings. Bei diesem Mechanismus sind keine großen Bewegungen der Phenylreste durch das Lösemittel notwendig, weshalb er sehr schnell ablaufen kann. Eine Reihe experimenteller und theoretischer Arbeiten beschäftigten sich mit der Problemstellung des Isomerisierungsmechanismus des Azobenzols. Eine Übersicht einiger Ergebnisse wird in [187] gegeben. Bis heute ist der genaue Isomerisierungsmechanismus des Azobenzols nicht eindeutig geklärt.

Für die thermische *cis*→*trans*-Isomerisierung im elektronischen Grundzustand gilt der Inversionsmechanismus für Azobenzol und viele Derivate als gesichert [183, 188]. Aus der Abhängigkeit der Isomerisierungsquantenausbeuten von der Anregungsenergie und der Auswahl des Lösungsmittels schlossen Bortolus und Monti 1979, dass sich die Reaktionsmechanismen nach Photoanregung des $n\pi^*$ - und $\pi\pi^*$ -Übergangs voneinander unterscheiden [181]. Die von Rau et al. durchgeführten Experimente an Azobenzolderivaten in den 80er Jahren, die durch entsprechende Reste an der Rotation um die N=N-Bindung gehindert wurden, zeigten, dass diese Moleküle isomerisieren konnten und dass für sie die Isomerisierungsquantenausbeuten nach $n\pi^*$ - und $\pi\pi^*$ -Anregung gleich groß waren [189, 190]. Sie wiesen zudem die gleichen Werte auf wie reines Azobenzol nach $n\pi^*$ -Anregung. Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte für die Isomerisierung des Azobenzols nach $n\pi^*$ -Anregung ein Inversions-Mechanismus postuliert werden. Weiterhin wurde aus diesen Ergebnissen gefolgert, dass die Rotation für die Isomerisierung nach $\pi\pi^*$ -Anregung eine wichtige Rolle spielt.

Ende der 1990er Jahre erlaubten Ultrakurzzeitexperimente direkte Einblicke in die Dynamik der Moleküle nach Photoanregung. Verschiedene transiente Absorptionsexperimente im UV/vis-Spektralbereich [178, 191, 192] und IR [193], Fluoreszenzexperimente [180, 194–196], Resonanz-Raman-Messungen [197–199], Photoelektronenspektroskopie [200, 201] sowie eine große Zahl theoretischer Arbeiten [184, 202–206] haben sich bereits mit dem Isomerisierungsmechanismus des Azobenzols und verschiedener Azobenzolderivate beschäftigt. Die hier genannten Literaturverweise stellen nur eine sehr kleine Auswahl aus der großen Anzahl an Arbeiten dar, die sich mit Azobenzol und seinen Derivaten beschäftigen, und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die älteren Modelle gehen davon aus, dass Azobenzol aus dem S_2 -Zustand über einen Rotationsmechanismus, aus dem S_1 -Zustand über Inversion relaxiert. Neuere Arbeiten zeichnen ein anderes Bild und zweifeln die Bedeutung eines Inversionsmechanismus für die Photoreaktion an. Sie beziehen in ihre Betrachtungen höher angeregte Zustände (S_3 , S_4) mit ein, die energetisch

dicht bei dem S_2 -Zustand liegen und doppelt angeregten Singulettzuständen zugeordnet werden ($S(n^2\pi^*)$). Diese wurden in den älteren Modellen nicht berücksichtigt. Die Existenz dieser höher angeregten Zustände konnte auch experimentell nachgewiesen werden. Demnach findet die Isomerisierung über eine Rotation im S_1 -Zustand statt. Über eine konische Durchschneidung gelangt das Molekül aus dem S_1 -Zustand zurück in den Grundzustand. Aus dem S_2 -Zustand findet eine schnelle Relaxation in den S_1 -Zustand statt, während die Population der S_3 - und S_4 -Zustände ohne zu isomerisieren zurück in den Grundzustand gelangt und dadurch die Isomerisierungsquantenausbeute verringert. Teilweise widersprechen die Modelle den experimentell gefundenen Daten, so dass bis keine eindeutige Klärung erzielt werden konnte. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass eine Modifizierung der Azobenzole, wie sie für einige der Experimente beispielsweise für sterische Einschränkungen genutzt wurden, auch mit Änderungen der elektronischen Struktur und der damit verbundenen Potentialflächen einher geht [207, 208]. Dies hat Auswirkungen auf die möglichen Reaktionspfade.

Einfluss der Substituenten

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, können die Eigenschaften des Photoschalters durch die Auswahl entsprechender Substituenten an den Phenylringen stark beeinflusst werden. Dabei spielen neben sterischen Effekten auch elektronische Eigenschaften eine bedeutende Rolle. So kann beispielsweise durch geeignete Substituenten die thermische Stabilität ebenso wie physikalische Eigenschaften wie z. B. das Dipolmoment oder die Lage der Absorptionsbanden beeinflusst werden. Rau nahm eine Klassifizierung der Azobenzolderivate vor, die neben der Art der Substituenten auch die spektralen Eigenschaften berücksichtigt [183, 209]:

- *Azobenzolartige Derivate*
Diese Derivate zeigen ähnliche spektrale Eigenschaften wie unsubstituiertes Azobenzol. Die Lage der Absorptionsbanden wird von der Polarität des Lösemittels kaum beeinflusst. Typischerweise können Derivate mit elektronenziehenden Substituenten dieser Klasse zugeordnet werden. Ihre thermische *cis*→*trans*-Isomerisierung findet bei Raumtemperatur im Zeitbereich von Stunden statt.
- *Amino-Azobenzole*
Hier ist einer oder beide der Phenylringe in der *ortho*- oder *para*-Position mit einer elektronenschiebenden Gruppe, beispielsweise einer Aminogruppe ($-\text{NH}_2$), substituiert. Daraus resultiert eine bathochrome Verschiebung der $\pi\pi^*$ -Bande, so dass diese häufig mit der $n\pi^*$ -Bande überlagert ist. Außerdem ist die spektrale Lage der Absorptionsbanden stark von der Polarität des Lösemittels abhängig. Die Zeitskala für die thermische Rückisomerisierung liegt im Minutenbereich.
- *Pseudo-Stilbene*
Diese Derivate besitzen an einem Phenylring einen elektronenziehenden, an dem

anderen einen elektronenschiebenden Substituenten in *para*-Position (Push-Pull-Substitution). Die asymmetrische Ladungsverteilung führt zu einer starken bathochromen Verschiebung der $\pi\pi^*$ -Bande, so dass eine Überlagerung oder sogar eine Vertauschung der Reihenfolge von $\pi\pi^*$ - und $n\pi^*$ -Bande möglich ist. Weiterhin zeigt das Spektrum eine starke Abhängigkeit von der Polarität des Lösemittels. Die thermische Rückisomerisierung ist sehr schnell und findet auf einer Sekundenzeitskala statt.

Diese Effekte müssen berücksichtigt werden, wenn, wie im Falle des in dieser Arbeit untersuchten Azopeptids, eine Azobenzolgruppe als Photoschalter eingesetzt wird. Andererseits erlaubt die Möglichkeit der Manipulation der Eigenschaften der Azobenzoleinheit auch die Anpassung an die jeweiligen Anforderungen an den Schalter durch geeignete Substitution.

5.1.4 Design der eingesetzten Azopeptide

Um die ersten Schritte in der Proteinfaltung untersuchen zu können, muss ein Polypeptid so gestaltet werden, dass es auf ein kurzes Signal hin mit einer Konformationsänderung reagiert. Ein möglicher Ansatz ist der Einbau eines photoschaltbaren Moleküls, z. B. Azobenzol, in das Peptidrückgrat. Durch eine aufwendige Synthese gelang es der Gruppe um L. Moroder Azobenzolderivate zu synthetisieren, die an einem Ende eine Carboxy-, am anderen Ende eine Amino-Funktion besitzen und somit als Pseudo-Aminosäuren in das Peptidrückgrat eingebracht werden konnten [210–212]. Bei einem Schalten von der *trans*- in die *cis*-Form ändert sich der End-zu-End-Abstand des Schalters erheblich. Durch geschickte Auswahl des Peptids und der Anbringung des Schalters kann mit der Konformationsänderung der Azobenzoleinheit die gewünschte Konformationsänderung im Peptid erreicht werden. Den größten Effekt erzielt man, wenn die Änderung des Abstands möglichst groß ist, weshalb die Substitution der Phenylreste des Schalters idealerweise in *para*-Position durchgeführt wird. Zwei von L. Moroder entwickelte Schaltermoleküle sind in Abbildung 5.5 gezeigt.

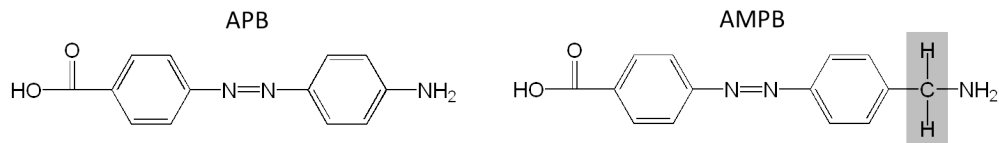


Abbildung 5.5: Struktur der von Moroder et al. entwickelten Schaltermoleküle APB und AMPB [213, 214]. Die Amino- und die Carboxygruppe erlauben einen Einbau in das Peptidrückgrat als Pseudo-Aminosäure.

Der Photoschalter 4(4'-Aminophenylazo)benzoesäure (APB) gehört mit der elektronenziehenden Carboxy- und der elektronenschiebenden Amino-Gruppe zur Klasse der Pseudo-Stilbene. Die $\pi\pi^*$ -Bande wird um fast 100 nm bathochrom verschoben und

überlappt mit der $n\pi^*$ -Bande [35, 215, 216]. Dies macht ein effizientes Schalten zwischen beiden Konformeren nur schwer möglich, da stets beide Übergänge der beiden Isomere angeregt werden. Bei 4(4'-Aminomethylphenylazo)benzoesäure (AMPB) wird durch den Einbau einer zusätzlichen Methylgruppe die Einbeziehung der Amino-Gruppe in das delokalisierte π -Elektronensystem des Azobenzols verhindert und man erhält für AMPB ein ähnliches Spektrum wie für reines Azobenzol mit separierten $n\pi^*$ - und $\pi\pi^*$ -Banden. Die $\pi\pi^*$ -Bande ist lediglich um 20 nm, die $n\pi^*$ etwa um 5 nm bathochrom verschoben [35, 215, 217].

Beide Schalter konnten erfolgreich in ein Peptidfragment integriert werden. Ziel war es, ein photoschaltbares zyklisches Peptid so zu gestalten, dass bei der Konformationsänderung des Schalters ein möglichst großer Einfluss auf die Konformation des Peptids genommen wird. Aus geometrischen Überlegungen muss die Peptidkette mindestens acht Aminosäuren lang sein, damit der Schalter überhaupt in beiden Konformationen vorliegen kann. In diesem Fall ist das Peptidrückgrat in der *trans*-Konformation gestreckt, während in der *cis*-Konformation eine Faltung des Rückgrats möglich ist. Das verwendete Peptidfragment wurde dem aktiven Zentrum der Thioredoxinreduktase aus *E. coli* nachempfunden und bestand zunächst aus der Sequenz ACATCDGF. In der Gruppe um L. Moroder wurden verschiedene zyklische und bicyklische Azo-Peptide mit variierenden Aminosäureabfolgen synthetisiert [35, 58, 59, 210–215, 217–221]. Außerdem wurden als Referenz auch lineare Azopeptide synthetisiert.

Für die linearen Peptide erwartet man keinen Einfluss der Schalterkonformation auf die Struktur des Rückgrats und somit ähnliche Ergebnisse wie für den Schalter ohne Peptidreste. Dies konnte auch experimentell gezeigt werden und erlaubte den Einsatz linearer Azopeptide als Referenzsysteme. Für die Synthese der zyklischen bzw. bicyklischen Peptide wurden zunächst lineare Peptide erzeugt, die anschließend zyklisiert wurden. Die Cystein-Gruppen der zyklischen Azopeptide, wenn diese Cysteine enthielten, waren dabei mit Schutzgruppen versehen, während bei den bicyklischen Azopeptiden nach Abspaltung der Schutzgruppen die Ausbildung einer Disulfidbrücke ermöglicht wurde. Ein weiterer Vorteil des AMPB-Schalters gegenüber des APB-Schalters zeigte sich bei der Analyse der NMR-Strukturen der bicyklischen Azopeptide. Aufgrund des starren Chromophors und der zusätzlichen konformationellen Einschränkung durch die Disulfidverbrückung konnte im Falle des APB-Peptids kein definierter Konformationsübergang mehr gewährleistet werden [213]. AMPB besitzt durch die zusätzliche Methylgruppe höhere Flexibilität und erlaubt ein effizientes Schalten der Azobenzoleinheit [214].

Die Azopeptide mit der Aminosäuresequenz aus der TrxR hatten allerdings den Nachteil, dass sie nicht wasserlöslich waren und daher in DMSO betrachtet wurden. Proteine kommen natürlicherweise jedoch in wässrigem Medium vor, weshalb Wasser als Lösemittel biophysikalisch von höchstem Interesse ist. Durch den Austausch einiger Aminosäuren konnte ein wasserlösliches, bicyklisches Azopeptid erzeugt werden. Das wasserlösliche Peptid hatte nun die Sequenz KCATCDKK. Der Sequenzabschnitt CATC des aktiven Zentrums blieb dabei unverändert. In Abbildung 5.6 ist die Entwicklung vom bicyklischen DMSO-löslichen APB-Peptid (bcAPB(DMSO)) über das bicyklische DMSO-lösliche AMPB-Peptid (bcAMPB(DMSO)) hin zum bicyklischen wasserlöslichen

AMPB-Peptid (bcAMPB(H₂O)) verdeutlicht. Mittels der oxidativen Rückfaltung von reduzierter und denaturierter RNase A konnte gezeigt werden, dass die *cis*-Form des bcAMPB(H₂O) im Gegensatz zur *trans*-Form biologische Aktivität besitzt [218, 219]. Es handelt sich bei bcAMPB(H₂O) also tatsächlich um ein biologisch aktives System, dessen Aktivität sich mit Hilfe des Photoschalters steuern lässt.

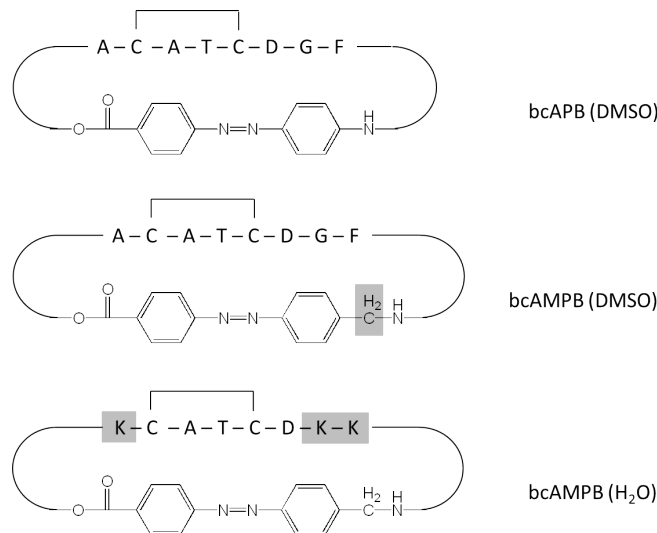


Abbildung 5.6: Entwicklungsprozess der bizyklischen Azopeptide. Die Änderungen in jedem Entwicklungsschritt sind jeweils grau unterlegt. Oben: Bizyklisches DMSO-lösliches APB-Peptid. Mitte: Bizyklisches DMSO-lösliches AMPB-Peptid. Der Methyllinker ermöglicht höhere Flexibilität und verhindert einen Einfluss der Aminogruppe auf das π -System der Azobenzoleinheit. Unten: Bizyklisches wasserlösliches AMPB-Peptid. Durch Substitution einiger Aminosäuren durch Lysin kann wasserlöslichkeit erreicht werden. Die Sequenz des aktiven Zentrums bleibt dabei erhalten.

Die Strukturbestimmung der bizyklischen DMSO- und wasserlöslichen AMPB-Peptide mittels NMR-Methoden zeigte, dass beide bcAMPB-Peptide in der *trans*-Form eine sehr definierte Struktur einnehmen, während für die *cis*-Konformation mehrere Anordnungen des Peptidrückgrats möglich sind [212, 214]. Dies steht in Einklang mit molekulardynamischen Rechnungen, die in der Arbeitsgruppe Stock durchgeführt wurden [59]. In Abbildung 5.7 sind exemplarisch jeweils die wahrscheinlichste Struktur für *trans*- und *cis*-bcAMPB(H₂O) gezeigt.

Die Dynamik der Isomerisierung von APB und der DMSO-löslichen APB-Peptide wurde ebenso mittels transientser UV/vis-Spektroskopie untersucht [35, 213, 216, 221] wie die von AMPB und der DMSO- und wasserlöslichen AMPB-Peptide [35, 215, 217, 220]. Allerdings kann mit Hilfe der Spektroskopie im UV/vis-Bereich nur der Chromophor betrachtet werden. Durch Vergleich der Dynamik des Azopeptids mit der des freien Schalters können Rückschlüsse auf den Einfluss des Peptidrückgrats gezogen werden. Dabei zeigte sich, dass durch die Aminosäurekette bei der *trans*→*cis*-Isomerisierung die Kinetik beschleunigt wurde, während sich bei der *cis*→*trans*-Isomerisierung die Reaktionsge-

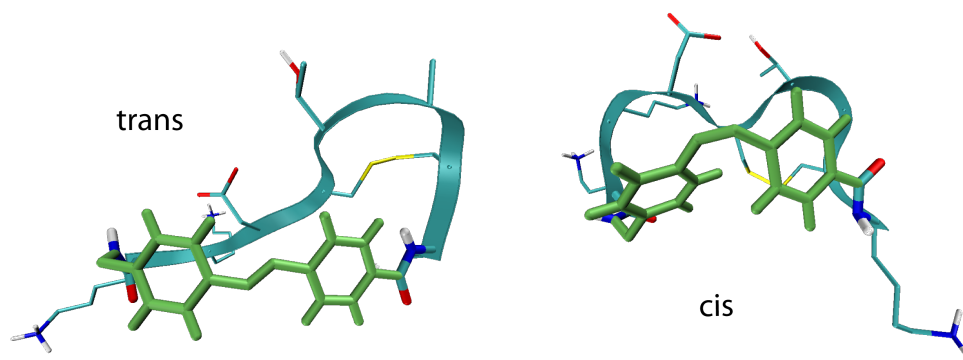


Abbildung 5.7: *trans*- und *cis*-Struktur von bcAMPB(H₂O). In der *trans*-Form ist das Peptidrückgrat gestreckt, während es in der *cis*-Konformation Flexibilität aufweist und mehrere verschiedene Konformationen einnehmen kann. Gezeigt ist hier die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit. Die Daten für die Erstellung dieser Abbildung wurden freundlicherweise von Gerhard Stock und Phuong Nguyen zur Verfügung gestellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms VMD erstellt [222].

schwindigkeit reduziert und eine weitere Zeitkonstante auf einer Nanosekundenzeitskala zu beobachten ist.

Eine direkte Betrachtung des Peptidrückgrats eröffnet die Spektroskopie im mittleren infraroten Spektralbereich. Die Informationen, die die IR-Spektroskopie über Proteine liefern kann wurden bereits in Kapitel 2.1.2 vorgestellt. bcAMPB(DMSO) wurde bereits mittels transientser Spektroskopie im IR-Spektralbereich untersucht und liefert Auskünfte über die Dynamik des Peptidrückgrats nach *cis*→*trans*-Isomerisierung des Photoschalters [58]. Die Amid I-Bande wurde hierbei als Indikator für eine Strukturveränderung des Peptidrückgrats genutzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Peptidrückgrat zunächst innerhalb der ersten 20 ps in einer stark getriebenen Phase auf die veränderte Struktur des Azoschalters reagiert. Auf längeren Zeitskalen finden noch weitere strukturelle Änderungen statt. Erst nach etwa 1 ms ist der Gleichgewichtszustand erreicht.

Transiente Untersuchungen an bcAMPB(DMSO) und wasserlöslichen bityklischem AMPB-Peptid (bcAMPB(H₂O)) im UV/vis-Spektralbereich deuten an, dass sich die Dynamik der beiden Proben nach Isomerisierung des Photoschalters voneinander unterscheiden [215, 220]. So konnte für bcAMPB(H₂O) eine Beschleunigung der Kinetiken auf der 10-100 ps-Zeitskala gegenüber der DMSO-löslichen Probe beobachtet werden, die auf die unterschiedlichen Viskositäten der Lösungsmittel zurückgeführt wurde. In dieser Arbeit soll dahingehend eine Untersuchung von bcAMPB(H₂O) durchgeführt und mit den Ergebnissen für das bcAMPB(DMSO) unter Einbeziehung der Ergebnisse der transienten UV/vis-Absorptionsexperimente verglichen werden. Weiterhin sollen die Ergebnisse mit molekulardynamischen Rechnungen, die in der Arbeitsgruppe Stock an bcAMPB(H₂O) durchgeführt wurden, verglichen und mit ihrer Hilfe ein entsprechendes molekulares Modell der Abläufe nach Isomerisierung des Schalters aufgestellt werden.

5.2 Experimentelle Vorgehensweise

Für die statischen sowie für die transienten spektroskopischen Untersuchungen wurde das in der Arbeitsgruppe Moroder synthetisierte bcAMPB(H₂O) verwendet. Die Synthese dieses Azopeptids wird in Referenz [212] beschrieben. Die Probe wurde in D₂O (99,9 %, Deutero GmbH) gelöst, so dass man bei einer Schichtdicke von 10 μm bei einer Wellenlänge von 330 nm eine Absorption von etwa 0,5 erhält.

Für die statische Charakterisierung im UV/vis-Spektralbereich wurde die Probe in eine Grabenküvette mit CaF₂-Fenstern mit einer Schichtdicke von 10 μm gebracht. Mit Hilfe der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Belichtungseinheit aus HgXe-Lampe und entsprechenden Glasfilterkombinationen wurden die photostationären Gleichgewichte in der Probe eingestellt. Die UV/vis-Absorptionsspektren wurden mit Hilfe eines Specord S 100 Spektrometers der Firma Analytik Jena aufgenommen.

Für die statische Charakterisierung im IR-Spektralbereich wurde für die Messungen in Transmissionsanordnung die selbe Küvette wie für die statischen Spektren im UV/vis verwendet. Die IR-Absorptionsspektren wurden mit einem Vector 22 FTIR-Spektrometer der Firma Bruker gemessen. Die Einstellung des photostationären Gleichgewichts wurde analog zu den Messungen im UV/vis erreicht. Für die ATR-FTIR-Messungen wurde ein baugleiches Spektrometer in Kombination mit einem ATR-Kristall (Diamant auf ZnSe) und einem MCT-Detektor verwendet. Ein Tropfen der Lösung wurde auf die Oberfläche des Kristalls aufgebracht und während des Verdampfens des Lösungsmittels kontinuierlich Spektren aufgenommen. Das Spektrum mit einer niedrigen Absorption des Lösungsmittels aber noch nicht vollständig eingetrockneter Probe wurde für die weitere Auswertung ausgewählt. Die spektrale Auflösung für die statischen FTIR-Experimente betrug jeweils 2 cm^{-1} .

Für die transienten Messungen im IR-Spektralbereich wurde eine Küvette bestehend aus zwei CaF₂-Fenstern mit einem Teflonring als Abstandhalter zwischen ihnen eingesetzt. Auf diese Weise wurde eine Schichtdicke von 50 μm erreicht. Der Anregungspuls mit einer Zentralwellenlänge von 425 nm und einer Pulsenergie von etwa 500 nJ wurde mittels Summenfrequenzmischung (NOPA und Laserfundamentale) in einem BBO-Kristall ($\theta = 26^\circ$), wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, generiert. Der Fokaldurchmesser in der Küvette betrug etwa 250 μm . Der breitbandige Abtastpuls mit einer Zentralwellenlänge von etwa 6 μm wurde, wie im selben Kapitel beschrieben, erzeugt und in die Küvette fokussiert. Der Fokaldurchmesser lag hier bei etwa 200 μm . Die Messungen wurden im unreferenzierten Modus durchgeführt. Die Einstellung der unterschiedlichen Winkel zwischen den Polarisationen von Anregungs- und Abtastpuls wurden mit Hilfe eines $\lambda/2$ -Plättchens im Strahlengang des Anregungspulses erreicht. Gleichzeitige Translation und Rotation der Küvette gewährleisteten den Austausch des Probevolumens zwischen zwei aufeinanderfolgenden Laserpulsen. Während der Messung wurde die Probe kontinuierlich mit der UV-Lampe in Kombination mit den Farbglasfiltern UG1 und WG320 belichtet (Zentralwellenlänge bei etwa 365 nm, siehe Abbildung 2.7). In der Probe wurde somit das photostationäre Gleichgewicht so verschoben, dass überwiegend cis-bcAMPB(H₂O) vorlag.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Statische Charakterisierung

UV/vis-Absorptionsspektren

In Abbildung 5.8 sind die UV/vis-Absorptionsspektren des in dieser Arbeit untersuchten bcAMPB(H₂O) gezeigt. Als Lösungsmittel wurde für alle Proben D₂O eingesetzt, da H₂O im Bereich der für unsere Untersuchungen relevanten Amid I-Bande der Peptide um 1650 cm⁻¹ eine starke Absorptionsbande besitzt [223].

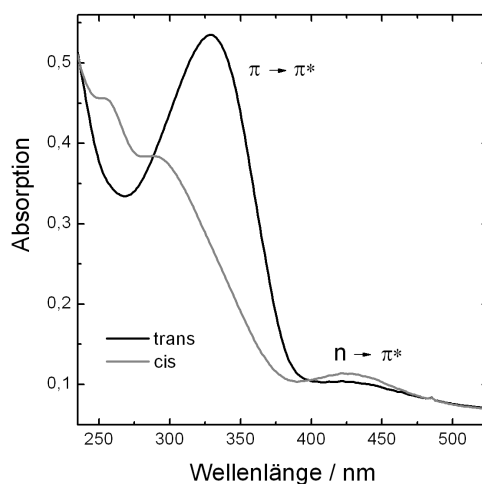


Abbildung 5.8: Statische UV-Vis-Spektren des bcAMPB(H₂O) in D₂O. Gezeigt sind jeweils die Spektren der photostationären Gleichgewichtszustände bei Belichtung mit der UV-Lampe bei 365 nm (überwiegend *cis*-Azopeptid), bzw. 436 nm (überwiegend *trans*-Azopeptid).

Die Abbildung zeigt die Spektren der Probe nach Belichtung mit der UV-Lampe in Verbindung mit der jeweiligen Filterkombination bei 365 nm (UG1 und WG320) bzw. 436 nm (BG3 und GG420) (siehe hierzu Abbildung 2.7) jeweils nach Erreichen des photostationären Gleichgewichts nach etwa acht Minuten. Die UV/vis-Absorptionsspektren stimmen gut mit denen des reinen Azobenzols in DMSO überein (vergleiche Tabelle 5.1) [178]. Daher gilt für bcAMPB(H₂O) die gleiche Bandenzuordnung wie für das unsubstituierte Azobenzol. Für bcAMPB(H₂O) konnte durch kontinuierliche Bestrahlung bei 365 nm etwa 70-80% der *cis*-Form erzeugt werden. Durch Belichtung bei 435 nm konnten über 90% der *trans*-Form angereichert werden. Die Lage des photostationären Gleichgewichts kann abgeschätzt werden, indem ein Spektrum der Probe im photostationären Gleichgewicht skaliert und von dem Spektrum der reinen *trans*-Form (thermisches Gleichgewicht) abgezogen wird, so dass gerade keine negativen Werte erzeugt werden. Der Skalierungsfaktor gibt dann Aufschluss über den *trans*-Anteil. Die Spektren ähneln denen für reines Azobenzol und zeigen deutlich getrennte $\pi\pi^*$ - bzw. $n\pi^*$ -Banden der *cis*- bzw. *trans*-Form des Azoschalters [175]. Dies ermöglicht auch die bevorzugte An-

regung eines der beiden Isomere, die zum einen zur Anreicherung des jeweils anderen Isomers im photostationären Gleichgewicht führt, zum anderen eine Anregung hauptsächlich eines Isomers durch Laserlicht einer ausgewählten Wellenlänge in transienten spektroskopischen Experimenten.

Absorptionsspektren im infraroten Spektralbereich

Abbildung 5.9 oben zeigt das FTIR-Spektrum der *trans*-Form von bcAMPB(H₂O) gelöst in D₂O. Im gezeigten Spektralbereich zwischen 1300 cm⁻¹ und 1900 cm⁻¹ erkennt man die Amid I-Bande um 1650 cm⁻¹. Diese wird jedoch überlagert von der Absorption des Lösungsmittels D₂O mit einem Absorptionsmaximum um 1555 cm⁻¹ [223] und darin enthaltenem HDO mit einer Absorptionsbande um 1460 cm⁻¹ [224, 225], sowie von Trifluoressigsäure, die bei der Aufreinigung des Peptids nicht vollständig entfernt werden konnte, um 1670 cm⁻¹ [226, 227]. Auf ein Abziehen des Lösemittelspektrums wurde aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der exakten Schichtdicke der Küvetten, sowie des leicht variierenden Gehalts an HDO in D₂O in zwei unterschiedlichen Proben, welches beispielsweise durch unterschiedlich lange Exposition der Probe mit Luft und der darin befindlichen Wassermoleküle zustande kommt, verzichtet.

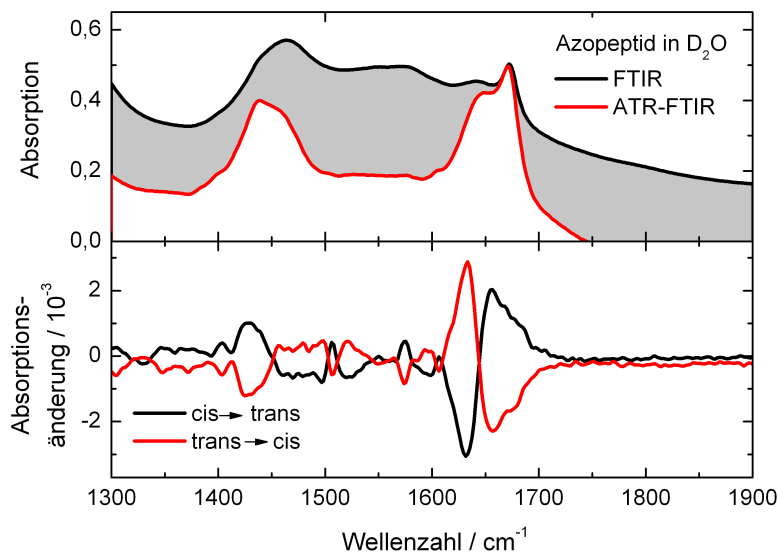


Abbildung 5.9: Statische FTIR-Spektren von bcAMPB(H₂O) in D₂O. Die obere Abbildung zeigt das Spektrum der *trans*-Form des Azopeptids in D₂O-Lösung in der Küvette, die auch für die statische UV/vis-Experimente verwendet wurde (schwarz). Außerdem ist das ATR-FTIR-Spektrum der *trans*-Form gezeigt, wobei noch Reste von Lösemittel in der Probe vorhanden waren (rot). Die Banden der *cis*-Form zeigen nur geringe Verschiebungen. Daher sind in der Abbildung unten die Differenzspektren der beiden Gleichgewichtszustände mit überwiegend *cis*-Azopeptid, bzw. überwiegend *trans*-Azopeptid gezeigt.

Deutlich wird der Einfluss des Lösemittels, wenn man das Spektrum der Probe mit sehr wenig Lösemittel betrachtet, wie es im Rahmen der Spektrenaufnahme an einem

ATR-FTIR-Gerät entstanden ist (Abbildung 5.9 oben). Über die Konzentration der Probe kann hier keine Aussage getroffen werden, es kann jedoch festgestellt werden, dass die breite Absorption um 1650 cm^{-1} der Amid I-Bande des Petids zugeordnet werden kann. Um 1670 cm^{-1} ist die breite Amid I-Bande überlagert von der Absorption der Trifluoressigsäure. Desweiteren erkennt man um 1450 cm^{-1} die Amid II'-Bande und zwischen 1300 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} absorbieren CH_3 -, CH_2 - und CH -Gruppen der Aminosäureseitenketten (zur Erläuterung siehe Kapitel 2.1.2). Des Weiteren liegt die Absorption der aromatischen Phenylschwingungen der Azobenzol-Einheit zwischen 1500 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} [9]. Die $\text{N}=\text{N}$ -Schwingung wird um 1575 cm^{-1} erwartet, sie ist aber meist nur sehr schwach oder sogar IR-inaktiv.

Sowohl für die in Transmission als auch für die mit Hilfe der ATR-Technik aufgenommenen FTIR-Spektren wurde eine Feinstrukturanalyse durchgeführt [228]. Dazu wurden die gemessenen Kurven zunächst mit einem Savitzky-Golay-Algorithmus durch eine lokale Anpassung eines Polynoms zweiter Ordnung über neun Datenpunkte geglättet. Der Abstand zweier Datenpunkte in den gemessenen Daten beträgt hier etwa 1 cm^{-1} . Das feinstrukturverstärkte Spektrum A_{FSV} wurde berechnet, indem von dem Originalspektrum A das geglättete Spektrum A_G multipliziert mit einem Faktor $g < 1$ abgezogen wird. In diesem Fall wurde ein Gewichtungsfaktor $g = 0,99$ eingesetzt. Um den Vergleich mit dem Originalspektrum zu ermöglichen wird die Differenz noch entsprechend skaliert:

$$A_{FSV} = \frac{A - gA_G}{1 - g} \quad (5.2)$$

Bei dieser Art der Feinstrukturverstärkung bleibt die ursprüngliche Form des Spektrums erhalten. Von der Glättung abweichende schmalbandige Signale und Schultern werden auf diese Weise besonders betont.

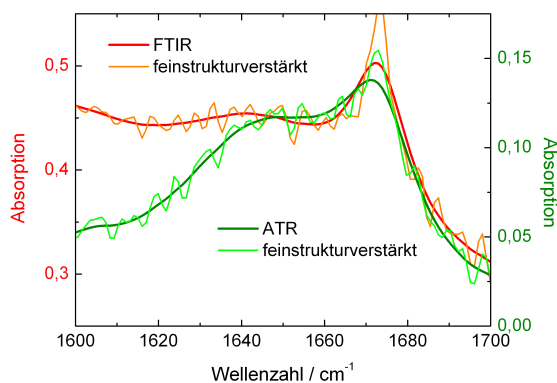


Abbildung 5.10: Ergebnisse der Feinstrukturverstärkung der in Transmission gemessenen FTIR- und der ATR-FTIR-Spektren.

Die Feinstrukturanalyse des FTIR-Spektrums gemessen in Transmission ergab, dass das Spektrum im Bereich der Amid I-Bande aus vielen einander überlagernden Absorptionsbanden der einzelnen $\text{C}=\text{O}$ -Schwingungen zusammensetzt, wobei jedoch

keine eindeutig separierten Banden ausgemacht werden konnten und auch eine Zuordnung einzelner Schwingungen zu einzelnen Aminosäuren nicht möglich ist (Abbildung 5.10). Das feinstrukturverstärkte FTIR-Spektrum, das mit Hilfe des ATR-Kristalls gemessen wurde, zeigt zwischen etwa 1620 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} eine ganz ähnliche Feinstruktur wie das in Transmission gemessene Spektrum. Die Lage vieler einzelner Maxima und Minima stimmt für beide Spektren überein und zeigt an, dass es sich tatsächlich um die Absorptionsbanden der einzelnen Amid I-Schwingungen handelt, die sich gegenseitig überlagern und nicht um verstärktes Rauschen.

Analog zu den UV/vis-Absorptionsspektren wurden FTIR-Spektren nach der Belichtung mit der UV-Lampe und den jeweiligen Filterkombinationen aufgenommen. Da die Differenzen in den FTIR-Spektren der *cis*- und der *trans*-Form des Azopeptids nur sehr gering sind, sind in Abbildung 5.9 jeweils die Differenzspektren zwischen den beiden photostationären Gleichgewichten gezeigt. Die Spektren wurden durch mehrfach aufeinanderfolgende Belichtung bei 375 nm (*trans*→*cis*) und 435 nm (*cis*→*trans*) bis zum Erreichen des jeweiligen photostationären Gleichgewichts und Differenzbildung zwischen anfänglichem und finalem FTIR-Spektrum jedes einzelnen Belichtungsschrittes erreicht. Das spiegelsymmetrische Verhalten der beiden Differenzspektren weisen auf die Reproduzierbarkeit und die Reversibilität des Schaltens des Azopeptids hin. Negative Banden im Differenzspektrum zeigen die Absorption des Ausgangszustands an, während positive Differenzbanden die Absorption des Produkts widerspiegeln. Die größten Differenzbanden beobachtet man im Bereich der Amid I-Bande zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} . Sowohl die Lage als auch die Form der Amid I-Bande ist stark abhängig von der Sekundärstruktur des Peptids (siehe Kapitel 2.1.2) [23, 24]. Strukturänderungen im Peptidrückgrat sollten sich also vor allem in der Amid I-Bande bemerkbar machen. Die Differenzbanden machen deutlich, dass beim Schalten des Azopeptids von seiner *cis*- in seine *trans*-Form die breite Amid I-Bande insgesamt eine Verschiebung hin zu größeren Wellenzahlen (hypsochrome Verschiebung) erfährt, während sie umgekehrt beim Schalten von *trans* nach *cis* insgesamt zu kleineren Wellenzahlen (bathochrome Verschiebung) verschoben wird. Zwischen 1660 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} ist in den Differenzspektren eine Feinstruktur zu erkennen, die vermutlich auf die Absorption und die unterschiedliche spektrale Verschiebung der Amid I-Banden der einzelnen Aminosäuren zurückzuführen ist. Neben der dominanten positiven und negativen Differenzbanden im Bereich der Amid I-Bande sind noch kleinere Nebenbanden unterhalb von 1600 cm^{-1} sowie eine positive Differenzbande im Bereich der Amid II'-Bande zu beobachten. Dies zeigt, dass auch die Amid II'-Bande sowie die Absorptionsbanden der Seitenketten bzw. des Azobenzols von den Strukturveränderungen durch die Isomerisierung betroffen sind. Die positive Differenzbande um 1580 nm kann hierbei der antisymmetrischen Streckschwingung der COO^- -Gruppe des Aspartats zugeordnet werden, während die anderen Differenzbanden verschiedenen CH_3 - und CH_2 -Moden zuzuschreiben sind (siehe Kapitel 2.1.2, Tabelle 2.1).

Ein Vergleich des FTIR-Spektrums von bcAMPB(H_2O) mit dem des bereits untersuchten bcAMPB(DMSO) (siehe Kapitel 5.1.4) zeigt, dass die Amid I-Bande des wasserlöslichen Peptids etwa 20 cm^{-1} bathochrom verschoben ist [58, 229]. Dies resul-

tiert aus der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu umgebenden Wassermolekülen (bzw. hier D_2O). Die Differenzspektren von bcAMPB(DMSO) zeigen jedoch ebenfalls eine bathochrome Verschiebung der Amid I-Bande beim Schalten aus der *cis*- in die *trans*-Form. Die FTIR-Differenzspektren der beiden Azopeptide deuten an, dass die Amid I-Bande im Falle von bcAMPB(H_2O) etwas breiter ist, als für bcAMPB(DMSO), was ebenfalls auf die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Peptidrückgrat und Lösungsmittel zurückzuführen ist. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der spektralen Breite der Absorptionsbande und des Differenzsignals besteht jedoch nicht, da die spektrale Breite des Differenzsignals auch von der Verschiebung der Absorptionsbanden abhängt.

Transiente Untersuchungen an einem wasserlöslichen Azopeptid mit neun Aminosäuren und ohne eine Disulfid-Verbrückung (dieses zyklische Peptid enthielt keine Cysteinreste, Ergebnisse nicht gezeigt) deuteten an, dass für eine Untersuchung des Peptids durch Schalten der Azobenzoleinheit in *cis*→*trans*-Richtung die besseren Ergebnisse zu erwarten wären. Hier waren innerhalb der Zeitauflösung deutliche Differenzbanden zu beobachten, die bei maximaler Verzögerungszeit (1,8 ns) eine ähnliche spektrale Signatur aufwiesen, wie das statische Differenzspektrum. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Modellrechnungen, die an diesem Azopeptid durchgeführt wurden [59]. Diese zeigen für die *cis*-Form des Azopeptids einen weitaus größeren Konformationsraum als für seine *trans*-Form. Ein Schalten des Azobenzols aus seiner *cis*-Form in seine *trans*-Form führt also zum Übergang eines Systems mit einem größeren konformationellen Spielraum zu einem System mit deutlich eingeschränkteren Möglichkeiten. Die unterschiedlichen Konformationen für die *cis*-Form von bcAMPB(H_2O) konnten bereits bei NMR-Untersuchungen der bityklischen AMPB-Peptide beobachtet werden [212, 214]. Man erwartet in *cis*→*trans*-Richtung eine schnellere und eindeutige Einstellung eines Gleichgewichts und somit schärfere Differenzsignale. Zudem ermöglicht die transiente Untersuchung des wasserlöslichen Azopeptids in *cis*→*trans*-Richtung einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen für bcAMPB(DMSO) [58, 229], bei dem ebenfalls der Übergang von der *cis*- in die *trans*-Konformation untersucht wurde.

5.3.2 Transiente Absorptionsspektroskopie im mittleren infraroten Spektralbereich

Abbildung 5.11 zeigt eine Übersicht der transienten Spektren von bcAMPB(H_2O) im Bereich der Amid I-Bande nach Photoanregung bei 425 nm. Durch Dauerbelichtung bei 375 nm (UV-Lampe mit entsprechender Filterkombination) wurde das photostationäre Gleichgewicht in Richtung der *cis*-Konformation verschoben. Somit konnte mit Hilfe der gewählten Versuchsanordnung der Schaltprozess in *cis*→*trans*-Richtung untersucht werden.

Zu negativen Verzögerungszeiten zeigt das transiente Differenzspektrum die charakteristische Signatur eines gestörten freien Induktionszerfalls (PFID) bei 1675 cm^{-1} . Da ein PFID-Signal nur dort zu beobachten ist, wo der Chromophor in seinem Ausgangszustand eine Absorptionsbande besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass in der *cis*-Konformation die Schwingung der C=O-Gruppe direkt am Azo-Schalter IR-Licht bei

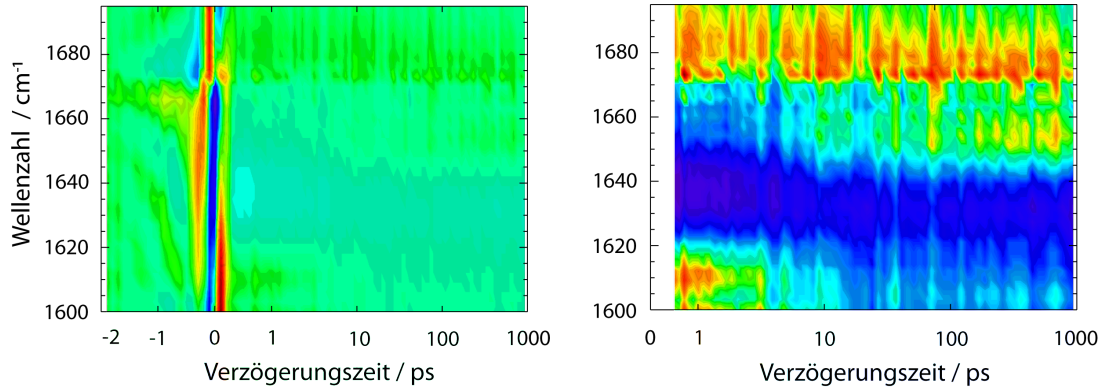


Abbildung 5.11: Transiente Absorptionsänderung von bcAMPB(H₂O) nach Photoanregung bei 425 nm. Anregungs- und Abtastpuls waren im magischen Winkel zueinander polarisiert. Die Zeitachse ist bis 1 ps linear und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. Die Abbildung links zeigt die gemessenen Daten zwischen -2 ps und 1000 ps. Hier zeigt sich besonders deutlich der gestörte freie Induktionszerfall zu negativen Verzögerungszeiten sowie die Kreuzphasenmodulation um den Zeitnullpunkt. Die rechte Abbildung zeigt die gemessenen transienten Daten ab 0,4 ps. Aufgrund der angepassten Farbskala lassen sich hier deutlich die Differenzsignale des Azopeptids betrachten und seine Dynamik verfolgen.

1675 cm⁻¹ absorbiert. Diese C=O-Gruppe ist als einzige Teil des konjugierten Systems des Azoschalters (vergleiche Abbildung 5.6 unten). Der entsprechende Spektralbereich ist im absoluten FTIR-Spektrum überlagert von der Absorption der Trifluoressigsäure.

Um den Zeitnullpunkt (-0,5 ps bis 0,5 ps) ist das Differenzspektrum der Probe von der Kreuzphasenmodulation (XPM) überlagert. Aufgrund der schwachen Differenzsignale ist sie in diesem Zeitbereich dominant und der charakteristische Verlauf der Differenzsignale (siehe hierzu Kapitel 2.3.4) ist vor allem zwischen 1600 cm⁻¹ und 1670 cm⁻¹ gut zu beobachten. Um 1675 cm⁻¹ ist er jedoch unterbrochen, zum einen durch das negative Signal des PFID, zum anderen durch ein ausgeprägtes positives Differenzsignal, das direkt nach der Photoanregung auftritt.

Ab etwa 0,4 ps nach der Photoanregung kann die Dynamik des Azopeptids ungestört beobachtet werden. Bei 1680 cm⁻¹ beobachtet man ein positives Signal, das seine Intensität über den gesamten gemessenen Zeitbereich nicht ändert. Dies wird vor allem deutlich, wenn das Spektrum zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Photoanregung betrachtet wird (Abbildung 5.12 links) oder man den transienten Verlauf bei einer ausgewählten Wellenlänge verfolgt (Abbildung 5.13 unten, rechts).

Im transienten Spektrum beobachtet man 0,4 ps nach der Photoanregung ein breites negatives Signal um 1640 cm⁻¹ sowie ein positives Signal um 1610 cm⁻¹ (Abbildung 5.11). Die spektrale Signatur macht deutlich, dass dieses Signal einer bathochrom verschobenen Amid I-Bande entspricht. Verfolgt man nun die Dynamik des Azopeptids, so erkennt man, dass die negative Differenzbande innerhalb von etwa 10-20 ps zu kleineren Wellenzahlen verschoben wird und danach bei etwa 1630 cm⁻¹ zentriert ist. Die Absorptionsänderung bei 1633 nm zeigt zunächst den Rückgang des negativen Signals

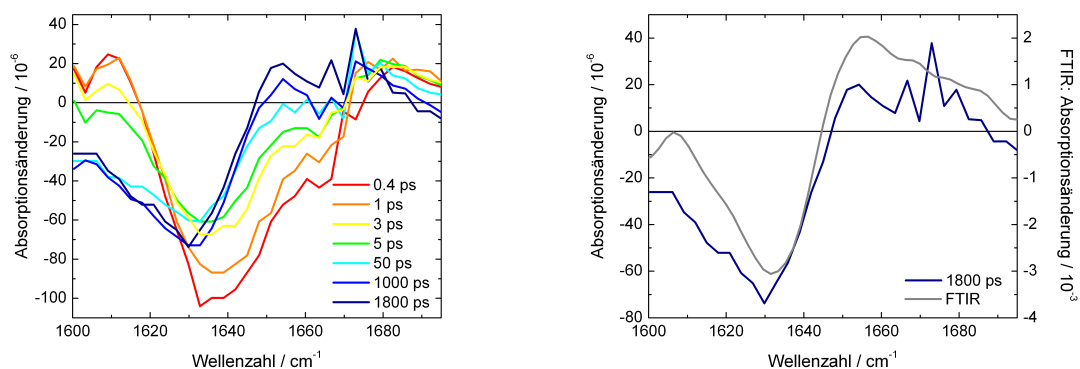


Abbildung 5.12: Links: Differenzspektren von bcAMPB(H₂O) in D₂O zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Photoanregung bei 425 nm. Rechts: Differenzspektrum bei der maximalen Verzögerungszeit (1,8 ns) im Vergleich zu dem FTIR-Differenzspektrum in *cis*→*trans*-Richtung. Der Offset zwischen beiden Kurven ist vermutlich auf leichte Verschiebungen der Hintergrundsignale und die geringen Signalintensitäten zurück zu führen.

und die anschließende Wiederrücknahme (Abbildung 5.13 oben, rechts). Gleichzeitig verschwindet die positive Absorptionsänderung bei 1610 cm⁻¹ (Abbildung 5.13 oben, links), während um 1655 cm⁻¹ ein positives Signal entsteht (Abbildung 5.13 unten, links). Die Betrachtung der Zeitschnitte macht deutlich, dass nach etwa 20 ps die Amid I-Bande insgesamt zu größeren Wellenzahlen im Vergleich zum Ausgangszustand verschoben wird (Abbildung 5.12 links). Auf längeren Zeitskalen finden nun nur noch geringe Veränderungen im transienten Spektrum statt, wie beispielsweise ein weiterer Anstieg des Signals um 1655 cm⁻¹, sowie ein Abfall des positiven Signals um 1690 cm⁻¹.

Der Vergleich des Differenzspektrums bei der maximalen Verzögerungszeit des Experiments (1,8 ns) mit dem statischen Differenzspektrum, zeigt bereits eine gute Übereinstimmung und deutet an, dass die grundlegenden Strukturveränderungen bereits nach etwa 10-20 ps abgeschlossen sind (Abbildung 5.12 rechts). Auf längeren Zeitskalen, im Bereich von einigen hundert Pikosekunden, finden noch kleine strukturelle Veränderungen des Peptidrückgrats statt. Um 1660 cm⁻¹ weist das Differenzspektrum bei 1,8 ns noch Unterschiede zum statischen Differenzspektrum auf und ist somit ein Indiz dafür, dass die endgültige Konformation des Peptids zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht ist. Bei der Feinstruktur, die in den Differenzspektren zu verschiedenen Verzögerungszeiten zwischen 1650 cm⁻¹ und 1680 cm⁻¹ beobachten werden kann, handelt es sich nicht um ein Artefakt, sie war in verschiedenen Messungen reproduzierbar und es wurden ähnliche Feinstrukturen auch in den Testmessungen an dem Peptid mit neun Aminosäuren und ohne Disulfidverbrückung beobachtet. Die spektrale Auflösung des Experiments beträgt für die Experimente dieser Arbeit 11,3 nm/Kanal, was eine genaue Untersuchung dieser Feinstruktur nicht möglich macht.

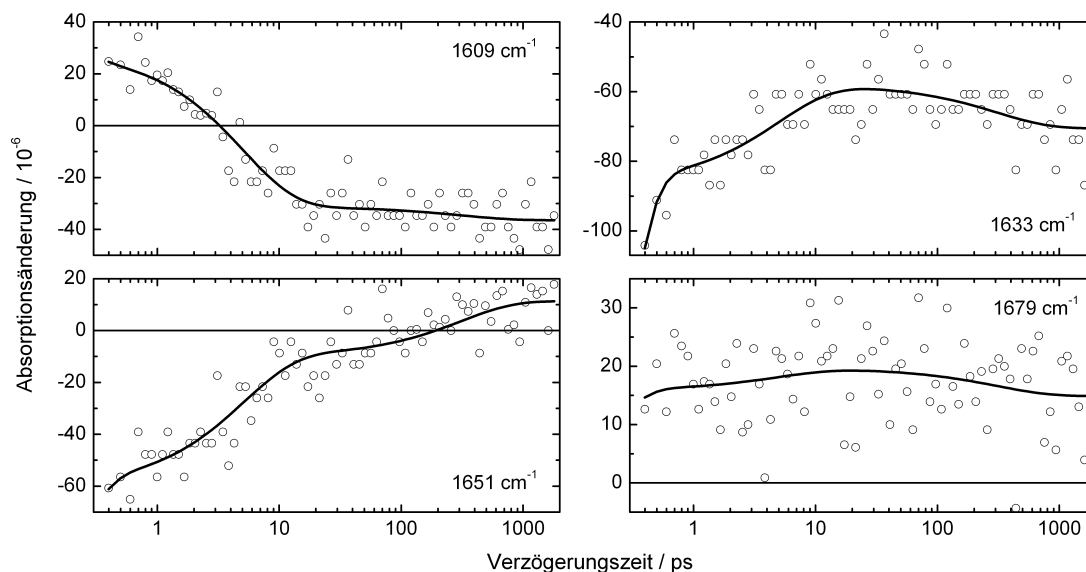


Abbildung 5.13: Transiente Absorptionsänderungen von bcAMPB(H₂O) in D₂O bei ausgesuchten Wellenzahlen. Die gemessenen Daten sind als Kreise dargestellt, die Linien repräsentieren die Ergebnisse der globalen Fitanalyse.

Photoschädigung der Probe

Um zu kontrollieren, ob sich die Zusammensetzung der Probe während der Messung ändert, beispielsweise durch eine Zerstörung der Probe oder die Anreicherung von Photoprodukten, wurde vor und nach der Messung jeweils ein UV/vis-Absorptionsspektrum aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 5.14 gezeigt.

Man erkennt deutlich eine Abnahme der Absorption in der $\pi\pi^*$ - und in der $n\pi^*$ -Bande. Gleichzeitig bildet sich eine Bande um 280 nm aus, die weder der *cis*- noch der *trans*-Form des Azopeptids zuzuordnen ist. Auch nach mehrtägiger Wartezeit kann keine Veränderung mehr an dem Spektrum der Probe festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Zerstörung der Azobenzoleinheit während der Messung hin. Eine Testmessung mit minimalem Probeneinsatz bestätigt, dass die Rückbelichtung der Probe mit der UV-Lampe und der UG1-WG320-Filterkombination verantwortlich für die Zerstörung der Probe ist. Für eine effiziente Messung der Azopeptidprobe ist sie jedoch unverzichtbar.

Ein Vergleich der transienten Daten der ersten 20 Messdurchläufe mit den letzten 20 Messdurchläufen zeigt, dass lediglich die Amplitude der letzten Messungen geringer ist, sich am transienten Verlauf jedoch keine messbaren Unterschiede feststellen lassen. Somit hat das entstandene Photoprodukt keinen Einfluss auf die noch vorhandenen funktionsfähigen bcAMPB(H₂O)-Moleküle und trägt nach Photoanregung bei 425 nm auch nicht zu den Differenzsignalen im betrachteten Spektralbereich bei. Daher können die gewonnenen Daten wie gewohnt weiterverarbeitet werden.

Verantwortlich für die Zerstörung der Azobenzoleinheit ist vermutlich die Anwesenheit

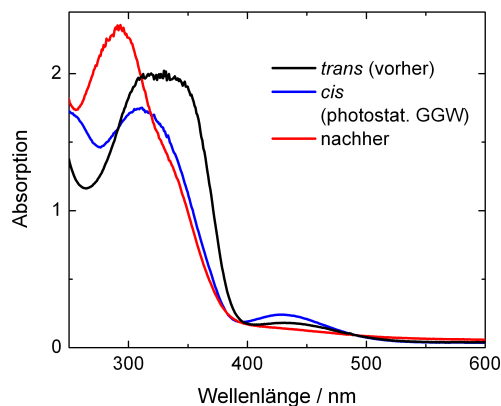


Abbildung 5.14: Statisches UV/vis-Absorptionsspektrum der Probe, die für die transienten Messungen eingesetzt wurde. Es sind jeweils die Spektren vor dem Experiment (ausschließlich *trans*-bcAMPB(H₂O)), nach Einstellung des photostationären Gleichgewichts durch Bestrahlung der Probe einige Minuten mit der UV-Lampe in Kombination mit den Farbglasfiltern UG1 und WG320 (überwiegend *cis*-AMPB(H₂O)) und nach einigen Stunden Messung mit Anregung bei 425 nm und ständiger Rückbelichtung. Aufgrund der für die transienten Messungen mit Abtastpuls im IR-Spektralbereich notwendigen hohen Konzentrationen ist die Absorption in einigen Spektralbereichen im UV-Bereich (< 400 nm) sehr hoch, was zu den verrauschten, nicht mehr aufgelösten Absorptionsbanden führt. Die Spektren werden daher nicht näher ausgewertet, geben aber einen Eindruck über die Änderung der Lage der Absorptionsbanden. Zudem ist deutlich das Verschwinden der $n\pi^*$ -Bande nach einigen Stunden Messzeit zu beobachten.

der Cysteine. Freie Sulfidgruppen sind dafür bekannt, dass sie mit der Azogruppe reagieren und zu einer Spaltung der N=N-Bindung führen können [230]. Freie Sulfidgruppen, die nicht Teil einer Disulfidbrücke sind, können entweder als Verunreinigung in der Probe vorhanden sein, oder sie können entstehen, wenn sich die Disulfidverbrückung im untersuchten Azopeptid öffnet. Eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande spricht zudem für eine Verkleinerung des delokalisierten π -Systems, was einer Spaltung der Azobenzoleinheit entsprechen würde. Diese Überlegung wird dadurch bestätigt, dass bei dem Azopeptid mit neun Aminosäuren ohne Cysteine, das zu Testzwecken gemessen wurde, keine Zerstörung der Probe während der Messung beobachtet werden konnte. Dass bei den vorangegangenen transienten Experimenten an bcAMPB(DMSO) und bcAMPB(H₂O) keine Zerstörung der Probe festgestellt werden konnte lag vermutlich an einer anderen Belichtungstechnik der Proben zur Einstellung des photostationären Gleichgewichts. Während bei den Messungen mit Abtastpuls im UV/vis-Spektralbereich eine Durchflussküvette verwendet und das Probenreservoir belichtet wurde [35, 215], wurden die bcAMPB(DMSO)-Proben für die transienten Messungen im mittelinfraroten Spektralbereich lediglich vor der Messung für > 30 Minuten belichtet und ebenfalls eine Durchflussküvette eingesetzt [229]. Aufgrund der begrenzten Probenmenge wurde in dieser Arbeit anstelle einer Durchfluss- eine Rotationsküvette eingesetzt, die einen geringeren Probeneinsatz erfordert. Auch wurden andere Lampen als Lichtquellen eingesetzt, was vermutlich mit unterschiedlichen Lichtintensitäten verbunden ist. Weiterhin ist

nicht auszuschließen, dass auch die Qualität der Proben für die verschiedenen transienten Experimente unterschiedlich war, z.B. der Anteil an freiem Cystein in der Lösung variierte.

Globale Fitanalyse

Die transienten Daten wurden einer globalen Fitanalyse unterzogen. Aufgrund der ausgeprägten Effekte um den Zeitnullpunkt wurden nur die Daten ab 0,4 ps in die Fitanalyse einbezogen. Hierbei konnten die Daten erfolgreich mit Hilfe von vier exponentiellen Zerfällen beschrieben werden. Eine kurze Zeitkonstante lag unterhalb der Zeitaufösung des Experiments. Sie wird hier daher nicht weiter behandelt. Sie ist beispielsweise gut in der Absorptionsänderung bei 1633 cm^{-1} zu beobachten (Abbildung 5.13 oben, rechts). Zwei weitere Zeitkonstanten $\tau_2 = 5\text{ ps}$ und $\tau_3 = 300\text{ ps}$ waren für die Beschreibung der Daten notwendig. Ihre zerfallassozierten Spektren sind in Abbildung 5.15 gezeigt. Die Zeitkonstante $\tau_\infty = \infty$ war für die Beschreibung der Signale bei maximaler Verzögerungszeit notwendig, und ihr zerfallassoziertes Spektrum entspricht dem Differenzspektrum zu diesem Zeitpunkt der Messung.

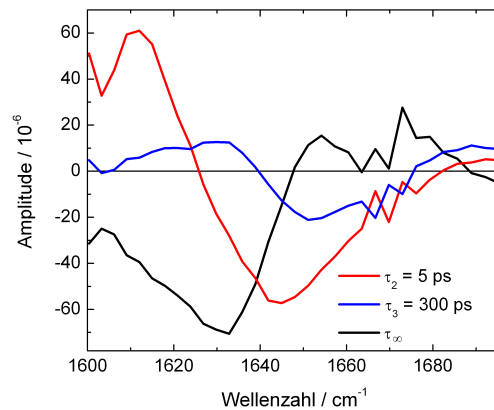


Abbildung 5.15: Zerfallassozierte Spektren der Zeitkonstanten aus der globalen Fitanalyse der transienten Daten des Azopeptids. Das Spektrum der Zeitkonstante $\tau_\infty = \infty$ repräsentiert das Differenzspektrum bei maximaler Verzögerungszeit des Experiments (1,8 ns).

Das zerfallassozierte Spektrum der Zeitkonstante τ_2 zeigt eine positive Amplitude zwischen 1600 cm^{-1} und 1625 cm^{-1} sowie eine negative Amplitude zwischen 1625 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} und ist damit dem Zerfall der Rotverschiebung der Amid I-Bande direkt nach Photoanregung, sowie der Ausbildung der anschließenden Blauverschiebung der Amid I-Bande zuzuordnen. Das zerfallassozierte Spektrum der τ_3 -Zeitkonstante besitzt zwischen 1605 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} eine positive, zwischen 1640 cm^{-1} und 1675 cm^{-1} eine negative Amplitude. Diese sind jedoch deutlich kleiner als die Amplituden der τ_2 -Zeitkonstanten und der τ_∞ -Zeitkonstanten, das dem Differenzspektrum bei 1,8 ns entspricht. Somit finden mit der Zeitkonstanten τ_3 nur noch kleinere spektrale Veränderungen statt.

Anisotropiemessungen

Neben den Messungen bei denen die Polarisierung von Anreg- und Abtastpuls im magischen Winkel ($54,7^\circ$) zueinander standen, um Polarisierungseffekte zu vermeiden, wurden auch polarisationsabhängige Messungen durchgeführt, bei denen die Polarisierungen der beiden Pulse senkrecht zueinander standen, bzw. parallel ausgerichtet waren. Unterhalb von $0,4\text{ ps}$ werden die Differenzsignale dominiert von der Kreuzphasenmodulation. Daher wird die Auswertung der Ergebnisse auf Verzögerungszeiten größer als $0,4\text{ ps}$ beschränkt. Desweiteren können transiente Absorptionsänderungen für einzelne Wellenzahlen nicht hinsichtlich der Anisotropie ausgewertet werden, wenn sie im betrachteten Zeitbereich Nulldurchgänge besitzen. Dies ist beispielsweise um 1610 cm^{-1} und um 1655 cm^{-1} der Fall (vergleiche Abbildung 5.11). Nach diesem Kriterium ist lediglich die Auswertung der Anisotropie für das durchweg positive Signal um 1680 cm^{-1} , sowie das negative Signal um 1630 cm^{-1} über den gesamten Zeitbereich von $0,4\text{ ps}$ bis $1,8\text{ ns}$ sinnvoll. Weiterhin bleiben auch um 1640 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} die Signale über den gesamten Messbereich negativ, ihr zeitlicher Verlauf wird von der transienten Blauverschiebung der Amid I-Bande dominiert. Eine Zuordnung der Anisotropiedaten zu einzelnen Winkeln zwischen den Übergangsdipolmomenten ist hier nicht möglich, da sich im untersuchten Spektralbereich viele Absorptionsbanden einzelner Oszillatoren gegenseitig überlagern. Dennoch können die Ergebnisse dabei helfen, weitere Informationen über den Prozess der Konformationsänderung von bcAMPB(H_2O) aus seiner *cis*- in seine *trans*-Form zu gewinnen.

In Abbildung 5.16 sind die transienten Absorptionsänderungen in paralleler und senkrechter Anordnung bei vier ausgewählten Wellenzahlen gezeigt. Die Messkanäle um die gezeigten weisen meist ähnliche Verläufe auf, die übrigen besitzen entweder Nulldurchgänge oder weisen keine signifikante Anisotropie auf. Bei allen Wellenzahlen liegen die Unterschiede zwischen den Daten aus paralleler und senkrechter Messanordnung nach etwa 10 ps im Bereich des Rauschens, weshalb auf eine Auswertung der Anisotropie zu späteren Zeitpunkten verzichtet wurde. Die ermittelten Anisotropieparameter sind ebenfalls in Abbildung 5.16 gezeigt. Weiterhin wurden für die Auswertung der Anisotropie nur diejenigen Kanäle berücksichtigt, bei denen der ermittelte Anisotropieparameter in einem sinnvollen Bereich zwischen $0,4$ und $-0,2$ lag.

Das positive Signal um 1683 cm^{-1} zeigt im Rahmen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses keinen nennenswerten Unterschied zwischen den Daten der parallelen und senkrechten Messung. Daher kann hier die Anisotropie nicht weiter ausgewertet werden. Die Unterschiede in den Absorptionsänderungen der parallelen und der senkrechten Messanordnung bei 1630 cm^{-1} zeigen einen deutlich negativen Anisotropieparameter, der innerhalb von etwa 10 ps zerfällt. Ähnliche Verläufe des Anisotropieparameters können auch für 1644 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten eine erhebliche Anisotropieänderung auf dieser Zeitskala an. Aufgrund der Ergebnisse im Bereich der Amid I-Bande kann geschlussfolgert werden, dass eine große Umorientierung der CO-Gruppen auf dieser Zeitskala stattfindet. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich bei der betrachteten Amid I-Bande um eine Überlagerung von neun

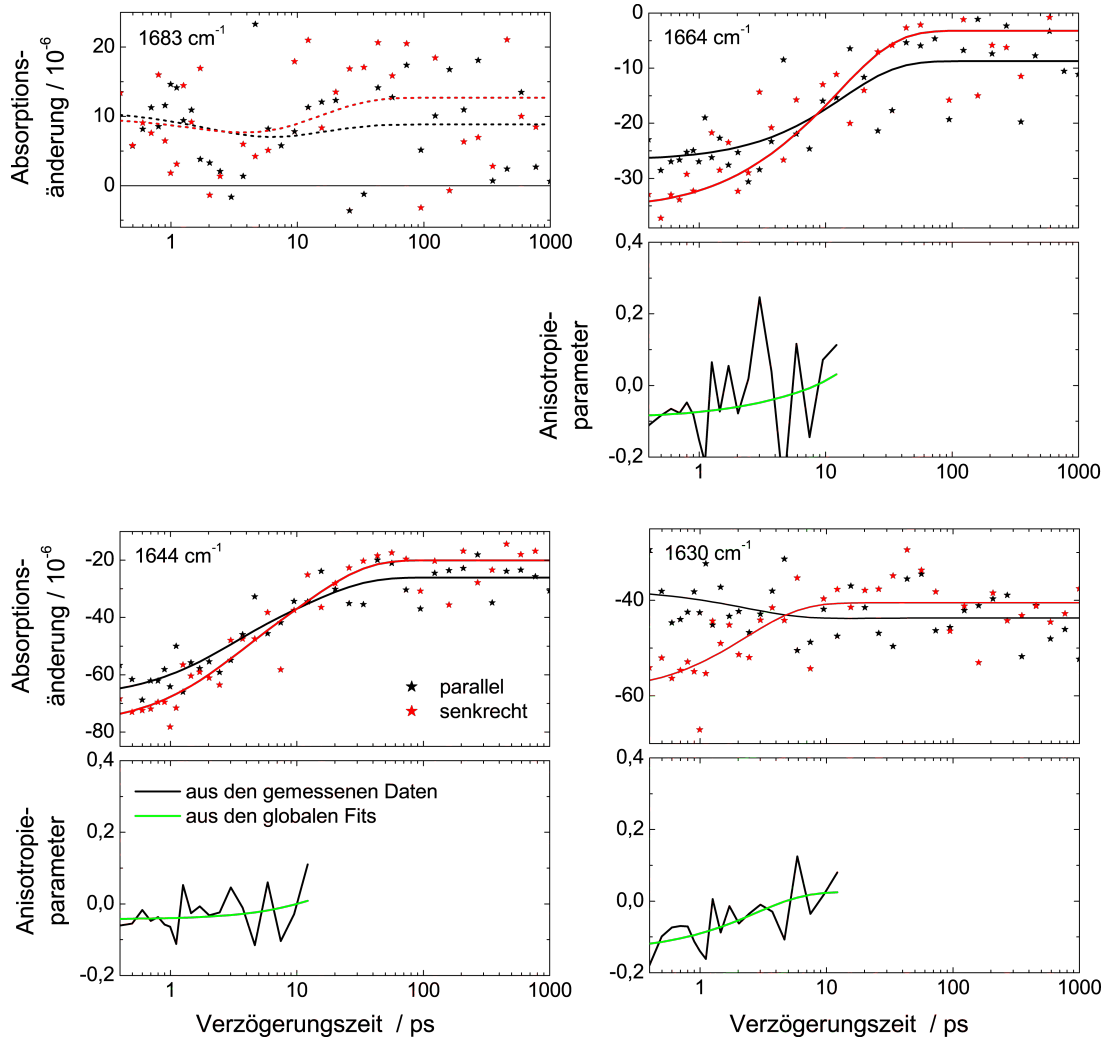


Abbildung 5.16: Transiente Absorptionsänderungen bei ausgewählten Wellenzahlen in paralleler und senkrechter Polarisation von Anregungs- und Abtastpuls und die zugehörigen Anisotropieparameter im sinnvoll auswertbaren Zeitbereich. Die Symbole zeigen die gemessenen Werte an, die durchgezogenen Linien die Ergebnisse der globalen Fitanalyse. Die Zeitkonstanten waren dabei mit den Zeitkonstanten für die Messung im magischen Winkel identisch. Um 1683 cm^{-1} lagen die Unterschiede zwischen paralleler und senkrechter Messanordnung im gesamten Zeitbereich unterhalb des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses, weshalb hier auf die Auswertung der Anisotropie verzichtet wurde (oben, links). Auf den übrigen Kanälen wurde aus den selben Gründen von einer Auswertung der Anisotropie für Verzögerungszeiten länger als 10 ps abgesehen.

C=O-Schwingungen handelt. Außerdem ist der Zerfall der Anisotropie aufgrund der Molekülrotation zu berücksichtigen. Für bcAMPB(DMSO) konnte ein Zerfall der Anisotropie nach etwa 200 ps beobachtet werden, der mit einer Rotationskorrelationszeit von 1,5 ns aus NMR-Relaxationsexperimenten in Einklang steht [58, 214]. Aufgrund

der geringeren Viskosität von D_2O gegenüber DMSO (etwa um den Faktor 1,8) wird für bcAMPB(H_2O) ein entsprechend schnellerer Zerfall der Anisotropie erwartet. Allerdings ist zu beachten, dass bcAMPB(H_2O) im Gegensatz zu bcAMPB(DMSO) drei langkettige Lysinreste enthält, deren polare Enden zusätzlich Hydrathüllen besitzen (vergleiche hierzu Abbildung 5.6). Dies könnte die Rotationsgeschwindigkeit des Azopeptids wiederum herabsetzen und den Zerfall der Anisotropie verlangsamen.

5.3.3 Diskussion

Die Messungen an bcAMPB(H_2O) beim Schaltvorgang aus seiner *cis*- in seine *trans*-Form zeigten, dass direkt nach Photoanregung eine Rotverschiebung der Amid I-Bande des Peptids zu beobachten ist. Diese Verschiebung der Bande zu kleineren Wellenzahlen wird heißen Banden zugeordnet und ist auch für bcAMPB(DMSO) sowie für ein lineares DMSO-lösliches Azopeptid zu beobachten [58]. Vergleichbare Kühleffekte nach Photoanregung der $n\pi^*$ -Bande können auch für unsubstituiertes *cis*-Azobenzol beobachtet werden [193]. Auf der gleichen Zeitskala wie die Relaxation der heißen Banden findet die Verschiebung der Amid I-Bande zu höheren Wellenzahlen statt. Bereits nach 10-20 ps ähnelt die spektrale Signatur des Differenzspektrums stark dem statischen Differenzspektrum der *cis*→*trans*-Richtung. Auf dieser Zeitskala findet die durch die Isomerisierung der Azobenzoleinheit initiierte Streckung des Peptidrückgrats statt. Dies wird auch durch die Anisotropiemessungen bestätigt, die andeuten, dass erhebliche Änderungen der Anisotropie innerhalb der ersten 10-20 ps stattfinden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen die für bcAMPB(H_2O) mit Abtastlicht im UV/vis-Spektralbereich gemacht wurden [215, 220]. Nach dieser ersten Phase befindet sich das Azopeptid jedoch noch nicht in seiner Gleichgewichtskonformation. Auf längeren Zeitskalen finden weitere kleine Reorganisationsprozesse des Peptidrückgrats statt, die mit einer Zeitkonstante von 300 ps zusammengefasst werden können. Bei maximaler Verzögerungszeit des Experiments von 1,8 ns ist noch immer nicht der Gleichgewichtszustand erreicht, was an den Abweichungen des Differenzsignals bei 1,8 ns vom statischen Differenzspektrum zu erkennen ist. Es finden also noch weitere Reorganisationsprozesse auf Nanosekundenzeitskalen statt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für bcAMPB(DMSO) beobachtet [58].

Die beobachteten Absorptionsänderungen im Bereich der Amid I-Bande setzten sich zusammen aus den neun einzelnen C=O-Schwingungen des Peptidrückgrats des Azopeptids. Das Signal des gestörten freien Induktionszerfalls zu negativen Verzögerungszeiten bei 1675 cm^{-1} deutet an, dass die Absorptionsbande der C=O-Gruppe direkt an der Azobenzoleinheit in der *cis*-Form des Peptids im Grundzustand bei 1675 cm^{-1} liegt. Durch die Überlagerung der einzelnen C=O-Schwingungen beobachtet man zu positiven Verzögerungszeiten bei dieser Wellenzahl kein negatives, sondern ein konstantes positives Signal. Die Tatsache, dass sich hier jedoch über den gesamten gemessenen Zeitbereich an dem Signal keine Intensitätsänderungen mehr zeigen, deutet an, dass sich die C=O-Schwingungen, die zu dem Differenzsignal beitragen, also auch die der C=O-Gruppe direkt am Azoschalter, bereits nach 0,4 ps in ihrer Gleichgewichtsposition befinden.

Die Ergebnisse für bcAMPB(H₂O) weisen große Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen für das bereits untersuchte bcAMPB(DMSO) auf [58]. Transiente Untersuchungen an beiden Azopeptiden mit Abtastlicht im UV/vis-Bereich deuten an, dass sowohl die Kühlprozesse als auch die Konformationsänderungen des wasserlöslichen Peptids doppelt so schnell ablaufen wie die des DMSO-löslichen. Als Ursache hierfür wurden die bessere Wärmeleitfähigkeit sowie die geringere Viskosität von Wasser im Vergleich zu DMSO angeführt [215, 220]. Diese ist für DMSO etwa um den Faktor 2,25 größer als für H₂O. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der transienten Messungen mit Abtastlicht im mittleren infraroten Spektralbereich für das DMSO- und das wasserlösliche Azopeptid zeigt keine eindeutige Verkürzung der Prozesse in Wasser. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Probe in deuteriertem Lösungsmittel untersucht wurden. D₂O weist im Vergleich zu H₂O eine um den Faktor 1,25 größere Viskosität auf [231]. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen auch die Notwendigkeit von Messungen im mittleren Infraroten für die direkte Betrachtung des Peptidrückgrats, während mit UV/vis-Abtastlicht lediglich das transiente Spektralverhalten des Chromophors verfolgt werden kann. Trotz der großen Ähnlichkeiten der Ergebnisse der transienten IR-Messungen können keine eindeutige Aussagen aus dem Vergleich der DMSO- und der wasserlöslichen bityklischen Azopeptide gezogen werden: Zum einen sind die Amid I-Banden der beiden Proben aufgrund der unterschiedlichen Lösemittel spektral gegeneinander verschoben. Zum Anderen waren für die Beschreibung der Daten der Messung im magischen Winkel zwischen 0,4 ps und 1,7 ns im Fall des DMSO-löslichen bityklischen Azopeptids fünf Zeitkonstanten (2,2 ps, 6,2 ps, 17 ps, 430 ps und 1 ns) notwendig, während die Daten der wasserlöslichen Probe sehr gut mit Hilfe von nur zwei Zeitkonstanten (5 ps und 300 ps) beschrieben werden konnten. Ein globaler Fit mit mehr Zeitkonstanten führte für die Daten von bcAMPB(H₂O) zu keinen sinnvollen Ergebnissen, was aber durchaus auch auf das schlechtere Signal-zu-Rausch-Verhältnis zurückgeführt werden kann. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass sich die beiden bityklischen Peptide in einigen Aminosäuren unterscheiden, was zu unterschiedlichen Rückgratkonformationen und somit zu unterschiedlichen Verschiebungen der Amid I-Banden führen kann. Die transienten IR-Messungen an bcAMPB(H₂O) geben letztlich keinen eindeutigen Hinweis auf eine schnellere Dynamik gegenüber bcAMPB(DMSO).

Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Anreg-Abtast-Experiments stehen ebenfalls in Einklang mit den Ergebnissen der Molekulardynamik-Rechnungen (MD), die in der Arbeitsgruppe Stock durchgeführt wurden [59]. Hier konnte gezeigt werden, dass die Anregungsenergie von der Azobenzoleinheit zunächst auf das Peptidrückgrat übertragen wird, was zu Schwingungsanregung und somit heißen Banden führt, und anschließend eine Übertragung der Energie auf umgebende Lösemittelmoleküle innerhalb von etwa 10-20 ps stattfindet. Für die Übertragung der kinetischen Energie des Azopeptids auf das Lösemittel konnte in den MD-Rechnungen eine Zeitkonstante von 7 ps ermittelt werden. Dies wird durch die anfängliche Rotverschiebung der Amid I-Bande und den Zerfall dieser Rotverschiebung mit einer Zeitkonstante von etwa 5 ps in den experimentell ermittelten Daten bestätigt. Weiterhin zeigen die MD-Rechnungen, dass sich unterschiedliche Parameter wie beispielsweise die Diederwinkel des Peptidrückgrats, der

End-zu-End-Abstand des Peptids (der im Wesentlichen die Länge des AMPB-Schalters widerspiegelt), der Trägheitsradius sowie die mittlere quadratische Abweichung (RMSD, engl. root mean square deviation) vom dominierenden *trans*-Zustand mit Zeitkonstanten im Bereich einiger Pikosekunden, einiger hundert Pikosekunden sowie einiger Nanosekunden ändern. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den aus der globalen Fitanalyse der experimentellen Daten ermittelten Zeitkonstanten von 5 ps, 300 ps und der Beobachtung, dass der Gleichgewichtszustand nach 1,8 ns noch nicht endgültig erreicht ist. Die Ergebnisse der MD-Rechnungen zeigen für jeden betrachteten Parameter verschiedene Zeitkonstanten, die im Einzelnen nicht in den Daten der IR-Experimente widerspiegelt werden. Diese zeigen lediglich eine globale Antwort des Systems auf die Photoanregung, die die Vielzahl der einzelnen Parameter zusammenfasst. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse aus MD-Rechnungen an bcAMPB(H₂O) zeigen außerdem, dass die Zeitkonstanten der Dynamik von Aminosäure zu Aminosäure bis zu einer Größenordnung varriieren können und somit auch die Verschiebung der einzelnen Amid I-Absorptionsbanden [232]. Eine globale Fitanalyse mit mehr Zeitkonstanten erwies sich für die in dieser Arbeit gemessenen Daten jedoch nicht als sinnvoll. Somit spiegeln die Zeitkonstanten eine Zusammenfassung mehrerer Prozesse mit ähnliche Zeitkonstanten wider. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass nicht alle photoangeregten Moleküle isomerisieren und auch diese zu den Differenzsignalen beitragen können.

Auf der Grundlage der in dieser Arbeit gemessenen experimentellen Daten, den transienten Daten, die für bcAMPB(H₂O) mit Abtastlicht im UV/vis-Spektralbereich aufgenommen wurden [215, 220] und der Ergebnisse der MD-Rechnungen [59] kann nun folgendes Modell aufgestellt werden: Nach Anregung der $n\pi^*$ -Bande des *cis*-Azopeptids befindet sich der Photoschalter zunächst im ersten angeregten Zustand (S_1). Innerhalb der Zeitauflösung gelangt der Großteil der Moleküle über eine konische Durchschneidung in den Grundzustand (S_0). Die Schwingungsenergie des heißen S_0 -Zustands wird zunächst auf das Peptid und innerhalb von 10-20 ps auf das umgebende Lösemittel verteilt. Gleichzeitig ändert sich die Geometrie der Azobenzoleinheit. Durch den Übergang von der anfänglichen *cis*- in die *trans*-Konformation wird das Peptidrückgrat gestreckt. Die grundlegenden Konformationsänderungen finden auf der Zeitskala von einigen Pikosekunden statt. Allerdings befindet sich das Azopeptid noch nicht im Gleichgewicht. Auf der Zeitskala von einigen hundert Pikosekunden bis einigen Nanosekunden finden noch weitere kleinere Änderungen statt, bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Fassung

Ziel dieser Arbeit war es zum einen Informationen über den Mechanismus in Dodecinproteinen zu gewinnen, der zu der effizienten Fluoreszenzlöschung von gebundenem Riboflavin und einer deutlichen Verlängerung der Lebensdauer des Chromophors unter Lichteinwirkung führt. Zum anderen sollte mit Hilfe eines kurzen Modellpeptids, das eine Azobenzoleinheit als Photoschalter in seinem Peptidrückgrat enthielt, erste Schritte der Peptidfaltung untersucht werden.

Die Untersuchungen an Dodecinproteinen konzentrierten sich hauptsächlich auf archaales Dodecin aus *Halobacterium salinarum* (HsDod). Eine Besonderheit der Dodecinproteine ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Flavinbindeproteinen zwei Flavinmoleküle in jeder ihrer sechs identischen Bindetaschen einbauen können. Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen im UV/vis-Spektralbereich zeigen, dass nach Photoanregung eines gebundenen Riboflavinmoleküls nach etwa 10 ps der Ausgangszustand wieder erreicht wird. Weiterhin zeigt das Fehlen der stimulierten Emission in den transienten Daten, dass bereits innerhalb der Zeitauflösung des Experiments, in weniger als 150 fs, der erste angeregte Zustand des Riboflavins entvölkert wird. Dies verhindert unerwünschte Reaktionen des Riboflavins und stellt eine Versorgung der Zelle mit diesem wichtigen Baustein für die Biosynthese von FMN und FAD sicher. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass zwei Spezies mit unterschiedlichen spektralen Signaturen und Lebensdauern an dem Löschungsmechanismus und der Wiedererlangung des Ausgangszustands beteiligt sind. Der Vergleich von HsDod-Proteinen in nicht-deutertem und deutertem Lösungsmittel sowie die spektrale Signatur der Spezies, die mit einer Zeitkonstante von etwa 800 fs zerfällt deuten an, dass ein Elektronen- sowie ein Protonentransfer Teil des Mechanismus sind. Mit Hilfe von HsDod-Proteinen, bei denen der Asparaginsäurerest unterhalb der Bindetasche, der für das Binden eines wasserkoordinierten Magnesiumions verantwortlich ist, gegen Serin (D41S) oder Glutaminsäure (D41E) ausgetauscht war, konnte gezeigt werden, dass das wasserkoordinierte Magnesiumion nicht relevant für den Löschungsmechanismus ist. Dennoch konnte eine Beteiligung von Wassermolekülen nicht ausgeschlossen werden. Die Beteiligung eines Elektronentransfers von einem Tryptophanrest in der Bindetasche auf das photoangeregte Flavin konnte durch Messungen an Dodecinproteinen mit Tryptophanderivaten mit unterschiedlichen Ionisationsenergien bestätigt werden.

Die Spezies, die mit einer Zeitkonstante von etwa 5 ps zerfällt, die ebenfalls zu einer Wiederbesetzung des Ausgangszustands führt, konnte nicht eindeutig identifiziert

werden. Die spektrale Signatur des zerfallassozierten Spektrums könnte neben einer neutralen Tryptophanspezies und einem kationischen Riboflavinradikal auch durch schwingungsangeregte Riboflavinmoleküle verursacht werden.

Eine Beteiligung der Ribitylkette am Mechanismus kann aufgrund der Ergebnisse von HsDod-gebundenem Lumiflavin ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte anhand der Ergebnisse für HsDod-gebundenes FAD, das in seiner geschlossenen Konformation gebunden wird, wobei der Adeninrest die zweite Position in der Bindetasche besetzt, eine Beteiligung des zweiten Flavins in der Bindetasche am Lösungsmechanismus sowie ein Beitrag zu den Differenzspektren ausgeschlossen werden. Somit dient die Besetzung einer Bindetasche mit zwei Flavinmolekülen vermutlich lediglich der Maximierung der Flavinbeladung. Nicht eindeutig geklärt werden konnte die Frage, ob es sich um einen sequentiellen oder parallelen Mechanismus handelt.

Neben archaealem wurde auch bakterielles Dodecin mittels transientser UV/vis-Spektroskopie untersucht. Für Dodecin aus *Halorhodospira halophila* (HhDod) konnte ebenfalls eine sehr schnelle Wiedererlangung des Ausgangszustands nach Photoanregung des gebundenen Riboflavins beobachtet werden. Allerdings spiegeln einige Unterschiede in den transienten Daten die Unterschiede in den Bindetaschen von archaealem und bakteriellem Dodecin wider und geben Hinweise darauf, dass die Funktionen in der Zelle für die Dodecine unterschiedlich sind. Diese Hypothese wird durch verschiedene Cofaktoren, Riboflavin und Lumichrom für HsDod und FMN für HhDod, *in vivo* unterstützt. Die ermittelten Zeitkonstanten sind für das bakterielle Dodecin etwas länger als für das archaeale und die transienten Daten weisen in den spektralen Signaturen der Differenzsignale sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten auf.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden erste Schritte der Peptidfaltung mit Hilfe eines wasserlöslichen bityklischen Modellpeptids, das den Photoschalter 4(4'-Aminomethylphenylazo)benzoesäure (AMPB) enthält, untersucht. Hierfür wurden Kurzzeitspektroskopische Messungen im mittleren infraroten Spektralbereich für den Schaltvorgang von der *cis*-Form des Azopeptids in die *trans*-Form durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, transiente Konformationsänderungen des Peptidrückgrats zu verfolgen. In der *cis*-Form kann das Peptid mehrere unterschiedliche Konformationen einnehmen, während der Konformationsraum für die *trans*-Form deutlich eingeschränkt ist. Nach der Photoanregung im Bereich der $n\pi^*$ -Bande der Azobenzoleinheit finden die grundlegenden konformationellen Änderungen innerhalb der ersten 10-20 ps statt. Dies wurde durch polarisationsabhängige Messungen bestätigt. Auf dieser Zeitskala finden die größten Änderungen in den transienten Differenzspektren statt, die auf Konformationsänderungen sowie Kühlprozesse zurückzuführen sind. Diese Prozesse konnten mit einer Zeitkonstanten von 5 ps zusammengefasst werden. Auf längeren Zeitskalen finden weitere Reorganisationsprozesse statt, die mit einer Zeitkonstante von 300 ps zusammengefasst werden können. Bei maximaler Verzögerungszeit des Experiments (1,8 ns) ist der Gleichgewichtszustand noch nicht erreicht und es finden weitere Prozesse auf längeren Zeitskalen statt. Im Vergleich zu einem ähnlichen bereits untersuchten DMSO-löslichen bityklischen AMPB-Peptid konnte keine schnellere Dynamik durch den Einsatz von Wasser als Lösemittel festgestellt

werden [58], wie es vorangegangene transiente Experimente im UV/vis-Spektralbereich an wasser- und DMSO-löslichen bityklischen Azopeptiden angedeutet hatten [215, 220]. Die Ergebnisse der transienten Messungen zeigen gute Übereinstimmungen mit molekuldynamischen Rechnungen [59]. Das so gewonnene Modell von den Prozessen nach der Isomerisierung des Photoschalters erlaubt Einblicke in erste Schritte bei der Faltung von Peptiden in ihrem natürlichen Lösungsmittel Wasser und die Zeitskalen der entsprechenden Prozesse.

6.2 English Version

The aim of this thesis was to gain information on the mechanism in dodecin proteins responsible for the efficient fluorescence quenching of bound riboflavin molecules and clearly longer lifetimes of the chromophore when exposed to light. Furthermore, initial steps of protein folding were studied by using a small model peptide involving an azobenzene as photoswitchable unit.

The studies on dodecin proteins were mainly concentrated on the archaeal dodecin from *Halobacterium salinarum* (HsDod). A special feature of dodecin in comparison with other flavin binding proteins is the integration of two flavin molecules in each of its six identical binding pockets. Ultrafast spectroscopy in the UV/vis spectral range showed that after photo-excitation of a dodecin-bound riboflavin molecule the initial groundstate is repopulated within approximately 10 ps. The lack of stimulated emission in the transient data indicates, that the excited state of the flavin is depopulated within the time resolution of the experiment, in less than 150 fs. This avoids unwanted side reactions of riboflavin and preserves it for the biosynthesis of FMN and FAD. Moreover, the results show that two species with different spectral signatures and lifetimes participate in the quenching mechanism and repopulation of the initial ground state. HsDod samples in deuterated and non-deuterated solvent as well as the spectral signature of the species, that decays with a time constant of approximately 800 fs, indicate that both an electron and a proton transfer is part of the mechanism. Below the binding pocket an aspartic acid (D41) is responsible for the binding of a water coordinated magnesium ion. The results of mutated HsDod proteins, with a serin (D41S) or a glutamic acid (D41E) replacing the aspartic acid, that do not bind a magnesium ion in that position, show that the water coordinated magnesium ion is not relevant for the quenching mechanism. However, a contribution of water molecules can not be excluded. The involvement of an electron transfer from a tryptophan residue in the binding pocket to the photoexcited flavin could be corroborated by the results of HsDod proteins with tryptophan derivatives with varying ionization energies.

The species that decays with a time constant of approximately 5 ps also repopulates the initial ground state, but could not be identified unambiguously. Due to the spectral signature of the decay associated spectrum a neutral tryptophan radical, a cationic riboflavin radical as well as cooling processes could contribute.

An involvement of the ribityl chain to the mechanism was excluded due to the results of HsDod bound lumiflavin. Furthermore, the results of HsDod bound FAD, which is incorporated in its closed conformation and the second position in the binding pocket is occupied by the adenine residue, show that the second flavin in the binding pocket has no influence on the quenching mechanism and does not contribute to the difference signals. Therefore, the load of two flavins per binding pocket merely maximizes of the flavin load. It could not be clarified unambiguously, if the two steps in the quenching pathway occur in parallel or sequentially.

Not only archaeal but also bacterial dodecin was studied by transient UV/vis-spectroscopy. For dodecin from *Halorhodospira halophila* (HhDod) also a fast repopulation of the initial ground state after photoexcitation of bound riboflavin could be observed. However, the observed differences in the transient data reflect the structural differences of the archaeal and bacterial dodecin binding pockets. Furthermore, they indicate different functions in the cell for the archaeal and bacterial dodecin, respectively. This theory is also corroborated by different cofactors *in vivo*, riboflavin and lumichrome for HsDod and FMN for HhDod. The time constants are longer for the bacterial dodecin and the spectral signatures show some similarities as well as some differences.

The second part of this thesis deals with the initial steps of peptide folding processes. Therefore a watersoluble bicyclic model peptide containing the photoswitch 4(4'-Aminomethylphenylazo)benzoic acid (AMPB) was studied by ultrafast spectroscopy in the mid-IR spectral region. The conformational changes from the *cis* to the *trans* form were studied. Femtosecond time resolved IR-spectroscopy allows to follow the transient conformational changes of the peptide backbone. While in its *cis* form the peptide can exist in several conformations with similar energies, the conformational space of the *trans* form is more restricted. After photoexcitation of the azobenzene unit in the spectral range of the $n\pi^*$ band the main spectral changes occur within the first 10-20 ps and are affirmed by polarization dependent measurements. On this time scale the most prominent changes in the difference spectra occur, due to conformational changes and cooling processes. These processes can be described by a single time constant of 5 ps. On longer time scales further reorganization processes take place and can be approximated with a time constant of 300 ps. At maximum delay time the final equilibration is not achieved yet and further processes occur on a nanosecond time scale. The results were compared to those of a DMSO-soluble bicyclic azopeptide and no faster dynamic could be observed for the water soluble azopeptide [58], as it has been proposed from the results of transient UV/vis-spectroscopy [215, 220]. The results of the transient measurements are in good agreement with molecular dynamic calculations [59]. The resulting processes after isomerization of the azoswitch give insights into initial steps of protein folding in the natural solvent water and the time scales of the corresponding processes.

Literaturverzeichnis

- [1] Falbe, J. und Regitz, M. (Hg.) *Römpp kompakt, Basislexikon Chemie* (Thieme Verlag, 1998)
- [2] White, H.B. und Merrill, A.H. *Riboflavin-binding proteins* Annu Rev Nutr (1988) **8**: 279–299
- [3] Mataga, N., Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Tanaka, F., Kido, N. und Kitamura, M. *Femtosecond fluorescence dynamics of flavoproteins: Comparative studies on flavodoxin, its site-directed mutants, and riboflavin binding protein regarding ultrafast electron transfer in protein nanospaces* J. Phys. Chem. B (2002) **106**: 8917–8920
- [4] Zhong, D. und Zewail, A.H. *Femtosecond dynamics of flavoproteins: charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2001) **98**: 11867–11872
- [5] Grininger, M. *The function of the halophilic dodecin* Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München (2006)
- [6] Bieger, B., Essen, L.O. und Oesterhelt, D. *Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from Halobacterium salinarum* Structure (2003) **11**: 375–385
- [7] Atkins, P. *Physikalische Chemie* (Wiley VCH, 2001)
- [8] Haken, H. und Wolf, H. *Molekülphysik und Quantenchemie-Einführung in die Experimentellen und theoretischen Grundlagen, 5. Auflage* (Springer Verlag, 2006)
- [9] Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 5. Auflage* (Georg Thieme Verlag, 1995)
- [10] Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 3. Auflage* (VCH Verlagsgesellschaft, 1987)
- [11] Demtröder, W. *Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken, 5. Auflage* (Springer Verlag, 2007)
- [12] Meschede, D. *Optik, Licht und Laser, 3. Auflage* (Vieweg+Teubner, 2008)
- [13] Boyd, R. *Nonlinear Optics, 3. Auflage* (Elsevier, 2008)

- [14] Demaria, A.J., Stetser, D.A. und Glenn, W.H. *Ultrashort light pulses* Science (1967) **156**: 1557–1568
- [15] Paschotta, R. *Encyclopedia of Laser Physics and Technology* (Wiley VCH, 2008)
- [16] French, P.M.W. *The generation of ultrashort laser pulses* Rep. Prog. Phys. (1995) **58**: 169–262
- [17] Shen, Y.R. *Principles of nonlinear optics* (Wiley VCH, 1984)
- [18] Jesse, K. *Femtosekundenlaser Einführung in die Technologie der ultrakurzen Lichtimpulse* (Springer Verlag, 2005)
- [19] Kasha, M. *Characterization of electronic transitions in complex molecules* Discuss. Faraday Soc. (1950) **9**: 14–19
- [20] Barth, A. *Infrared spectroscopy of proteins* Biochim. Biophys. Acta (2007) **1767**: 1073–1101
- [21] Barth, A. und Zscherp, C. *What vibrations tell us about proteins* Q. Rev. Biophys. (2002) **35**: 369–430
- [22] Krimm, S. und Bandekar, J. *Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins* Adv. Protein Chem. (1986) **38**: 181–364
- [23] Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. und Ruyschaert, J.M. *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures* Subcell. Biochem. (1994) **23**: 405–450
- [24] Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. und Ruyschaert, J.M. *Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films* Eur. J. Biochem. (1990) **193**: 409–420
- [25] Moore, W.H. und Krimm, S. *Transition dipole coupling in Amide I modes of /beta polypeptides* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1975) **72**: 4933–4935
- [26] Ippen, E.P., Liu, L.Y. und Haus, H.A. *Self-starting condition for additive-pulse mode-locked lasers* Opt. Lett. (1990) **15**: 183–185
- [27] Tamura, K., Haus, H.A. und Ippen, E.P. *Self-starting additive pulse mode-locked erbium fibre ring laser* Electron. Lett. (1992) **28**: 2226–2228
- [28] Matsas, V., Newson, T., D., R. und D., P. *Selfstarting passively mode-locked fibre ring soliton laser exploiting nonlinear polarisation rotation* Electron. Lett. (1990) **28**: 1391–1393

-
- [29] Hofer, M., Ober, M., Haberl, F. und Fermann, M. *Characterization of ultrashort pulse formation in passively mode-locked fiber Lasers* IEEE J. Quantum. Electron. (1992) **28**: 720–728
- [30] Fermann, M.E., Andrejco, M.J., Silberberg, Y. und Stock, M.L. *Passive mode locking by using nonlinear polarization evolution in a polarization-maintaining erbium-doped fiber* Opt. Lett. (1993) **18**: 894–896
- [31] Strickland, D. und Mourou, G. *Compression of amplified chirped optical pulses* Optics Communications (1985) **56**: 219–221
- [32] Vaillancourt, G., Norris, T.B., Coe, J.S., Bado, P. und Mourou, G.A. *Operation of a 1-kHz pulse-pumped Ti:sapphire regenerative amplifier* Opt. Lett. (1990) **15**: 317–319
- [33] Clark-Inc. *Manual Clark MXR, CPA 2001 Lasersystem*
- [34] Fork, R.L., Shank, C.V., Hirlimann, C., Yen, R. und Tomlinson, W.J. *Femtosecond white-light continuum pulses* Opt. Lett. (1983) **8**: 1–3
- [35] Spörlein, S. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen* Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München (2001)
- [36] Reed, M.K., Steiner-Shepard, M.K., Armas, M.S. und Negus, D.K. *Microjoule-energy ultrafast optical parametric amplifiers* J. Opt. Soc. Am. B (1995) **12**: 2229–2236
- [37] Alfano, R.R. und Shapiro, S.L. *Observation of self-phase modulation and small-scale filaments in crystals and glasses* Phys. Rev. Lett. (1970) **24**: 592–594
- [38] Chin, S.L. *Femtosecond laser filamentation* (Springer Verlag, 2010)
- [39] Brodeur, A. und Chin, S.L. *Ultrafast white-light continuum generation and self-focusing in transparent condensed media* J. Opt. Soc. Am. B (1999) **16**: 637–650
- [40] Brodeur, A. und Chin, S.L. *Band-gap dependence of the ultrafast white-light continuum* Phys. Rev. Lett. (1998) **80**: 4406–4409
- [41] Huber, R., Satzger, H., Zinth, W. und Wachtveitl, J. *Noncollinear optical parametric amplifiers with output parameters improved by the application of a white light continuum generated in CaF₂* Opt. Commun. (2001) **194**: 443–448
- [42] Piel, J., Beutler, M. und Riedle, E. *20-50-fs pulses tunable across the near infrared from a blue-pumped noncollinear parametric amplifier* Opt. Lett. (2000) **25**: 180–182

- [43] Riedle, E., Beutter, M., Lochbrunner, S., Piel, J., Schenkl, S., Spörlein, S. und Zinth, W. *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR* Appl. Phys. B (2000) **71**: 457–465
- [44] Wilhelm, T., Piel, J. und Riedle, E. *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter* Opt. Lett. (1997) **22**: 1494–1496
- [45] Fork, R.L., Martinez, O.E. und Gordon, J.P. *Negative dispersion using pairs of prisms* Opt. Lett. (1984) **9**: 150–152
- [46] Kozma, I., Baum, P., Lochbrunner, S. und Riedle, E. *Widely tunable sub-30 fs ultraviolet pulses by chirped sum frequency mixing* Opt. Express (2003) **11**: 3110–3115
- [47] Hamm, P., Kaindl, R.A. und Stenger, J. *Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources* Opt. Lett. (2000) **25**: 1798–1800
- [48] Neumann, K. *Untersuchung ultraschneller Strukturodynamik photoschaltbarer Moleküle mittels Femtosekunden-Infrarotspektroskopie* Dissertation Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main (2010)
- [49] Wynne, K., Haran, G., Reid, G.D., Moser, C.C., Dutton, P.L. und Hochstrasser, R.M. *Femtosecond infrared spectroscopy of low-lying excited states in reaction centers of Rhodospirillum rubrum* J. Phys. Chem. (1996) **100**: 5140–5148
- [50] Goldenhoff, N., Amarie, S., Gundermann, K., Beer, A., Büchel, C. und Wachtveitl, J. *Oligomerization and pigmentation dependent excitation energy transfer in fucoxanthin-chlorophyll proteins* Biochim. Biophys. Acta (2010) **1797**: 543–549
- [51] Lenz, M.O. *Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen photoinduzierter Ladungstransferreaktionen* Dissertation Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main (2005)
- [52] Dobryakov, A.L., Kovalenko, S.A. und Ernsting, N.P. *Electronic and vibrational coherence effects in broadband transient absorption spectroscopy with chirped supercontinuum probing* J. Chem. Phys. (2003) **119**: 988–1002
- [53] Dobryakov, A.L., Kovalenko, S.A. und Ernsting, N.P. *Coherent and sequential contributions to femtosecond transient absorption spectra of a rhodamine dye in solution* J. Chem. Phys. (2005) **123**: 044502
- [54] Dobryakov, A., Lustres, J.P., Kovalenko, S. und Ernsting, N. *Femtosecond transient absorption with chirped pump and supercontinuum probe: Perturbative calculation of transient spectra with general lineshape functions, and simplifications* Chem. Phys. (2008) **347**: 127–138

- [55] Kovalenko, S.A., Dobryakov, A.L., Ruthmann, J. und Ernsting, N.P. *Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing* Phys .Rev. A (1999) **59**: 2369–2384
- [56] Sellmeier *Zur Erklärung der abnormen Farbenfolge im Spectrum einiger Substanzen* Ann. Phys. (1871) **219**: 272–282
- [57] Neumann, K., Verhoefen, M.K., Weber, I., Glaubitz, C. und Wachtveitl, J. *Initial reaction dynamics of proteorhodopsin observed by femtosecond infrared and visible spectroscopy* Biophys. J. (2008) **94**: 4796–4807
- [58] Bredenbeck, J., Helbing, J., Sieg, A., Schrader, T., Zinth, W., Renner, C., Behrendt, R., Moroder, L., Wachtveitl, J. und Hamm, P. *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2003) **100**: 6452–6457
- [59] Nguyen, P.H., Staudt, H., Wachtveitl, J. und Stock, G. *Real time observation of ultrafast peptide conformational dynamics: molecular dynamics simulation vs infrared experiment* J. Phys. Chem. B (2011) **115**: 13084–13092
- [60] Hamm, P. *Coherent effects in femtosecond infrared spectroscopy* Chem. Phys. (1995) **200**: 415–429
- [61] Wynne, K. und Hochstrasser, R. *The theory of ultrafast vibrational spectroscopy* Chem. Phys. (1995) **193**: 211–236
- [62] Lorenc, M., Ziolk, M., Naskrecki, R., Karolczak, J., Kubicki, J. und Maciejewski, A. *Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy* Appl. Phys. B (2002) **74**: 19–27
- [63] Ekvall, K., van der Meulen, P., Dhollande, C., Berg, L.E., Pommeret, S., Naskrecki, R. und Mialocq, J.C. *Cross phase modulation artifact in liquid phase transient absorption spectroscopy* J. Appl. Phys. (2000) **87**: 2340–2352
- [64] Moyon, N.S. und Mitra, S. *Fluorescence solvatochromism in lumichrome and excited-state tautomerization: a combined experimental and DFT study* J. Phys. Chem. A (2011) **115**: 2456–2464
- [65] Tyagi, A. und Penzkofer, A. *Absorption and emission spectroscopic characterization of lumichrome in aqueous solutions* Photochem. Photobiol. (2011) **87**: 524–533
- [66] Song, P.S., Sun, M., Koziolowa, A. und Koziol, J. *Phototautomerism of lumichromes and alloxazines* Journal of the American Chemical Society (1974) **96**: 4319–4323
- [67] Stanley, R.J. und Jang, H. *Electronic structure measurements of oxidized flavins and flavin complexes using Stark-effect spectroscopy* J. Phys. Chem. A (1999) **103**: 8976–8984

- [68] Stanley, R.J. und MacFarlane *Ultrafast excited state dynamics of oxidized flavins: Direct observations of quenching by purines* J. Phys. Chem. A (2000) **104**: 6899–6906
- [69] Neiss, C., Saalfrank, P., Parac, M. und Grimme, S. *Quantum chemical calculation of excited states of flavin-related molecules* J. Phys. Chem. A (2003) **107**: 140–147
- [70] Sun, M., Moore, T.A. und Song, P.S. *Molecular luminescence studies of flavins. I. The excited states of flavins* J. Am. Chem. Soc. (1972) **94**: 1730–1740
- [71] Wouters, J., Durant, F., Champagne, B. und André, J.M. *Electronic properties of flavins: Implications on the reactivity and absorption properties of flavoproteins* Int. J. Quantum Chem. (1997) **64**: 721–733
- [72] Yu, M.W., Fritchie, C.J., Fucaloro, A.F. und Anex, B.G. *Polarization characteristics of flavin spectra. Specular reflectivity of bis(10-methylisoalloxazine)copper(II) perchlorate tetrahydrate* J. Am. Chem. Soc. (1976) **98**: 6496–6500
- [73] Müller, F. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (CRC Press, Boca Raton, 1991)
- [74] Heelis, P.F. *The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines)* Chem. Soc. Rev. (1982) **11**: 15–39
- [75] Moore, W.W. und Ireton, R.C. *The photochemistry of riboflavin V. The photodegradation of isoalloxazines in alcoholic solvents* Photochem. Photobiol. (1977) **25**: 347–356
- [76] Grajek, H., Zurkowska, G. und Kuśba, J. *Influence of diffusion on nonradiative energy transfer between FMN molecules in aqueous solutions* J. Photochem. Photobiol. B (2005) **80**: 145–155
- [77] Grajek, H., Gryczynski, I., Bojarski, P., Gryczynski, Z., Bharill, S. und Kulak, L. *Flavin mononucleotide fluorescence intensity decay in concentrated aqueous solutions* Chem. Phys. Lett. (2007) **439**: 151–156
- [78] Grajek, H., Drabent, R., Zurkowska, G. und Bojarski, C. *Absorption of the flavin dimers* Biochim. Biophys. Acta (1984) **801**: 456–460
- [79] Grajek, H., Zurkowska, G., Drabent, R. und Bojarski, C. *The structure of the flavomononucleotide dimer* Biochim. Biophys. Acta (1986) **881**: 241–247
- [80] Drabent, R. und Grajek, H. *The flavin dimers I. The application of absorption in anti-stokes excitation region to investigate the flavin dimer formation* Biochim. Biophys. Acta (1983) **758**: 98–103
- [81] Weber, G. *Fluorescence of riboflavin and flavin-adenine dinucleotide* Biochem. J. (1950) **47**: 114–121

- [82] Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Mataga, N., Tanaka, F. und Visser, A.J.W.G. *The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale* Chem. Phys. Lett. (2003) **378**: 354–358
- [83] Barrio, J.R., Tolman, G.L., Leonard, N.J., Spencer, R.D. und Weber, G. *Flavin 1, N 6 -ethenoadenine dinucleotide: dynamic and static quenching of fluorescence* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1973) **70**: 941–943
- [84] Brazard, J., Usman, A., Lacomat, F., Ley, C., Martin, M.M. und Plaza, P. *New insights into the ultrafast photophysics of oxidized and reduced FAD in solution* J. Phys. Chem. A (2011) **115**: 3251–3262
- [85] van den Berg, P.A.W., Feenstra, K.A., Mark, A.E., Berendsen, H.J.C. und Visser, A.J.W.G. *Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics* J. Phys. Chem. B (2002) **106**: 8858–8869
- [86] Sengupta, A., Khade, R.V. und Hazra, P. *pH dependent dynamic behavior of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) in femtosecond to nanosecond time scale* Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry (2011) **221**: 105–112
- [87] Mewies, M., McIntire, W.S. und Scrutton, N.S. *Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs* Protein Sci. (1998) **7**: 7–21
- [88] Williams, C.J. *Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase - A family of flavoenzyme transhydrogenases. In chemistry and biochemistry of flavoenzymes* Bd. Vol. 3 (CRC Press, Boca Raton, 1992)
- [89] Williams, C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K. und Schirmer, R.H. *Thioredoxin reductase* Eur. J. Biochem. (2000) **267**: 6110–6117
- [90] van Stokkum, I.H.M., Gauden, M., Crosson, S., van Grondelle, R., Moffat, K. und Kennis, J.T.M. *The primary photophysics of the Avena sativa phototropin 1 LOV2 domain observed with time-resolved emission spectroscopy* Photochem. Photobiol. (2011) **87**: 534–541
- [91] van der Horst, M.A. und Hellingwerf, K.J. *Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families.* Acc. Chem. Res. (2004) **37**: 13–20
- [92] Sundström, V. *Femtobiology* Annu. Rev. Phys. Chem. (2008) **59**: 53–77

- [93] Crosson, S. und Moffat, K. *Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2001) **98**: 2995–3000
- [94] Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T.J., Batschauer, A. und Ahmad, M. *The cryptochromes: Blue light photoreceptors in plants and animals* Annual Review of Plant Biology (2011) **62**: 335–364
- [95] Liu, Z., Tan, C., Guo, X., Kao, Y.T., Li, J., Wang, L., Sancar, A. und Zhong, D. *Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2011) **108**: 14831–14836
- [96] Gomelsky, M. und Klug, G. *BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms* Trends Biochem. Sci. (2002) **27**: 497–500
- [97] Udvarhelyi, A. und Domratcheva, T. *Photoreaction in BLUF receptors: proton-coupled electron transfer in the flavin-Gln-Tyr system* Photochem. Photobiol. (2011) **87**: 554–563
- [98] Gauden, M., van Stokkum, I.H.M., Key, J.M., Lührs, D.C., van Grondelle, R., Hegemann, P. und Kennis, J.T.M. *Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2006) **103**: 10895–10900
- [99] Kennis, J.T.M. und Groot, M.L. *Ultrafast spectroscopy of biological photoreceptors* Curr. Opin. Struct. Biol. (2007) **17**: 623–630
- [100] Mathes, T., van Stokkum, I.H.M., Bonetti, C., Hegemann, P. und Kennis, J.T.M. *The hydrogen-bond switch reaction of the Blrb Bluf domain of Rhodobacter sphaeroides* J. Phys. Chem. B (2011) **115**: 7963–7971
- [101] Gauden, M., Grinstead, J.S., Laan, W., van Stokkum, I.H.M., Avila-Perez, M., Toh, K.C., Boelens, R., Kaptein, R., van Grondelle, R., Hellingwerf, K.J. und Kennis, J.T.M. *On the role of aromatic side chains in the photoactivation of BLUF domains* Biochemistry (2007) **46**: 7405–7415
- [102] Grininger, M., Staudt, H., Johansson, P., Wachtveitl, J. und Oesterhelt, D. *Dodecin is the key player in flavin homeostasis of archaea* J. Biol. Chem. (2009) **284**: 13068–13076
- [103] Meissner, B., Schleicher, E., Weber, S. und Essen, L.O. *The dodecin from Thermus thermophilus, a bifunctional cofactor storage protein* J. Biol. Chem. (2007) **282**: 33142–33154
- [104] Liu, F., Xiong, J., Kumar, S., Yang, C., Ge, S., Li, S., Xia, N. und Swaminathan, K. *Structural and biophysical characterization of Mycobacterium tuberculosis dodecin Rv1498A* J. Struct. Biol. (2011) **175**: 31–38

- [105] Grant, W.D., Gemmell, R.T. und McGenity, T.J. *Halobacteria: the evidence for longevity* Extremophiles (1998) **2**: 279–287
- [106] Manstein, D.J., Pai, E.F., Schopfer, L.M. und Massey, V. *Absolute stereochemistry of flavins in enzyme-catalyzed reactions* Biochemistry (1986) **25**: 6807–6816
- [107] Gross, E., Kastner, D.B., Kaiser, C.A. und Fass, D. *Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell* Cell (2004) **117**: 601–610
- [108] Gross, E., Sevier, C.S., Vala, A., Kaiser, C.A. und Fass, D. *A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Ero2p* Nat. Struct. Biol. (2002) **9**: 61–67
- [109] Mataga, N., Chosrowjan, H., Shibata, Y., Tanaka, F., Nishina, Y. und Shiga, K. *Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace* J. Phys. Chem. B (2000) **104**: 10667–10677
- [110] Penzkofer, A. und Leupacher, W. *Fluorescence behaviour of highly concentrated rhodamine 6G solutions* J. Lumin. (1987) **37**: 61–72
- [111] Grininger, M., Zeth, K. und Oesterhelt, D. *Dodecins: a family of lumichrome binding proteins* J. Mol. Biol. (2006) **357**: 842–857
- [112] Grininger, M., Seiler, F., Zeth, K. und Oesterhelt, D. *Dodecin sequesters FAD in closed conformation from the aqueous solution* J. Mol. Biol. (2006) **364**: 561–566
- [113] Vinzenz, X., Grosse, W., Linne, U., Meissner, B. und Essen, L.O. *Chemical engineering of Mycobacterium tuberculosis dodecin hybrids* Chem. Commun. (Camb) (2011) **47**: 11071–11073
- [114] Nissen, M.S., Youn, B., Knowles, B.D., Ballinger, J.W., Jun, S.Y., Belchik, S.M., Xun, L. und Kang, C. *Crystal structures of NADH:FMN oxidoreductase (EmoB) at different stages of catalysis* J. Biol. Chem. (2008) **283**: 28710–28720
- [115] Tanaka, F., Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Mataga, N., Sato, K., Nishina, Y. und Shiga, K. *Donor-acceptor distance-dependence of photoinduced electron-transfer rate in flavoproteins* J. Phys. Chem. B (2007) **111**: 5694–5699
- [116] Mataga, N., Chosrowjan, H., Shibata, Y. und Tanaka, F. *Ultrafast fluorescence quenching dynamics of flavin chromophores in protein nanospace* J. Phys. Chem. B (1998) **102**: 7081–7084
- [117] Phillips, R.S., Cohen, L.A., Annby, U., Wensbo, D. und Gronowitz, S. *Enzymatic synthesis of Thia-L-tryptophans* Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995) **5**: 1133–1134
- [118] Minks, C., Alefelder, S., Moroder, L., Huber, R. und Budisa, N. *Towards New Protein Engineering: In Vivo Building and Folding of Protein Shuttles for Drug*

- Delivery and Targeting by the Selective Pressure Incorporation (SPI) Method* Tetrahedron (2000) **56**: 9431–9442
- [119] McLean, D.J. und Giese, A.C. *Absorption spectra of proteins and amino acids after ultraviolet irradiation* J. Biol. Chem. (1950) **187**: 537–542
- [120] Massey, V. und Ganther, H. *On the interpretation of the absorption spectra of flavoproteins with special reference to D-amino acid oxidase* Biochemistry (1965) **4**: 1161–1173
- [121] Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J.M. und Mayhew, S.G. *Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins* Biochemistry (1974) **13**: 589–597
- [122] Koziol, J. und Knobloch, E. *The solvent effect on the fluorescence and light absorption of riboflavin and lumiflavin* Biochim. Biophys. Acta (1965) **102**: 289–300
- [123] MacFarlane und Stanley, R.J. *Evidence of powerful substrate electric fields in DNA photolyase: Implications for thymidine dimer repair* Biochemistry (2001) **40**: 15203–15214
- [124] Marcus, R. und Sutin, N. *Electron transfers in chemistry and biology* Biochim. Biophys. Acta (1958) **811**: 265–322
- [125] Marcus, R. *On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer . 1.* J. Chem. Phys. (1956) **24**: 966–978
- [126] Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X. und Dutton, P.L. *Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction* Nature (1999) **402**: 47–52
- [127] Moser, C.C. und Dutton, P.L. *Engineering protein structure for electron transfer function in photosynthetic reaction centers* Biochim. Biophys. Acta (1992) **1101**: 171–176
- [128] Page, C.C., Moser, C.C. und Dutton, P.L. *Mechanism for electron transfer within and between proteins* Curr. Opin. Chem. Biol. (2003) **7**: 551–556
- [129] Moser, C.C., Keske, J.M., Warncke, K., Farid, R.S. und Dutton, P.L. *Nature of biological electron transfer* Nature (1992) **355**: 796–802
- [130] Hopfield, J.J. *Electron transfer between biological molecules by thermally activated tunneling* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1974) **71**: 3640–3644
- [131] Niemz, A., Imbriglio, J. und Rotello, V.M. *Model systems for flavoenzyme activity: One- and two-electron reduction of flavins in aprotic hydrophobic environments* J. Am. Chem. Soc. (1997) **119**: 887–892

- [132] DeFelippis, M.R., Murthy, C.P., Broitman, F., Weinraub, D., Faraggi, M. und Klapper, M.H. *Electrochemical properties of tyrosine phenoxy and tryptophan indolyl radicals in peptides and amino acid analogs* J. Phys. Chem. (1991) **95**: 3416–3419
- [133] Moser, C.C., Page, C.C., Chen, X. und Dutton, P.L. *Biological electron tunneling through native protein media* J. Biol. Inorg. Chem. (1997) **2**: 393–398
10.1007/s007750050149
- [134] Moser, C.C., Page, C.C., Farid, R. und Dutton, P.L. *Biological electron transfer* J. Bioenerg. Biomembr. (1995) **27**: 263–274 10.1007/BF02110096
- [135] Raststätter, D. *Quantenchemische Untersuchungen zum Absorptionsspektrum und Quenchingmechanismus in Dodecin* Diplomarbeit Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main (2011)
- [136] Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M. und Brettel, K. *Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor* Nat. Struct. Biol. (2003) **10**: 489–490
- [137] Baldwin, J., Krebs, C., Ley, B.A., Edmondson, D.E., Huynh, B.H. und Bollinger, J.M. *Mechanism of rapid electron transfer during oxygen activation in the R2 subunit of Escherichia coli ribonucleotide reductase. 1. Evidence for a transient tryptophan radical* J. Am. Chem. Soc. (2000) **122**: 12195–12206
- [138] Solar, S., Getoff, N., Surdhar, P.S., Armstrong, D.A. und Singh, A. *Oxidation of tryptophan and N-methylindole by N_3 , Br_2^- and $(SCN)_2^-$ radicals in light- and heavy-water solutions: a pulse radiolysis study* J. Phys. Chem. (1991) **95**: 3639–3643
- [139] Massey, V. *The chemical and biological versatility of riboflavin* Biochem. Soc. Trans. (2000) **28**: 283–296
- [140] Massey, V. und Palmer, G. *On the existence of spectrally distinct classes of flavo-protein semiquinones. A new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones* Biochemistry (1966) **5**: 3181–3189
- [141] Miura, R. *Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity* Chem. Rec. (2001) **1**: 183–194
- [142] Schelvis, J.P.M., Pun, D., Goyal, N. und Sokolova, O. *Resonance Raman spectra of the neutral and anionic radical semiquinones of flavin adenine dinucleotide in glucose oxidase revisited* J. Raman Spectrosc. (2006) **37**: 822–829
- [143] Land, E.J. und Swallow, A.J. *One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. II. Riboflavin* Biochemistry (1969) **8**: 2117–2125
- [144] Porcal, G., Bertolotti, S.G., Previtali, C.M. und Encinas, M.V. *Electron transfer quenching of singlet and triplet excited states of flavins and lumichrome by aromatic and aliphatic amines* Phys. Chem. Chem. Phys. (2003) **5**: 4123–4128

- [145] Kondo, M., Heisler, I.A., Stoner-Ma, D., Tonge, P.J. und Meech, S.R. *Ultrafast dynamics of protein proton transfer on short hydrogen bond potential energy surfaces: S65T/H148D GFP* J. Am. Chem. Soc. (2010) **132**: 1452–1453
- [146] Nishina, Y., Sato, K., Shi, R., Setoyama, C., Miura, R. und Shiga, K. *On the ligands in charge-transfer complexes of porcine kidney flavoenzyme D-amino acid oxidase in three redox states: a resonance Raman study* J. Biochem. (2001) **130**: 637–647
- [147] Li, G. und Glusac, K.D. *Light-triggered proton and electron transfer in flavin cofactors* J. Phys. Chem. A (2008) **112**: 4573–4583
- [148] Moore, W.M., Spence, J.T., Raymond, F.A. und Colson, S.D. *Photochemistry of Riboflavin. I. The Hydrogen Transfer Process in the Anaerobic Photobleaching of Flavins* J. Am. Chem. Soc. (1963) **85**: 3367–3372
- [149] Song, P.S. und Metzler, D.E. *Photochemical degradation of flavins-IV. Studies of the anaerobic photolysis of riboflavin* Photochem. Photobiol. (1967) **6**: 691–709
- [150] Song, S.H., Dick, B. und Penzkofer, A. *Photo-induced reduction of flavin mononucleotide in aqueous solutions* Chem. Phys. (2007) **332**: 55–65
- [151] Islam, S.D., Susdorf, T., Penzkofer, A. und Hegemann, P. *Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer* Chem. Phys. (2003) **295**: 137–149
- [152] Li, H., Jiang, Z. und Zhang, R. *Fluorescence quenching and the binding interaction of lumichrome with nucleic acids* Chin. Sci. Bull. (2010) **55**: 2829–2834
- [153] Sikorski, M., Sikorska, E., Koziolowa, A., Moreno, R.G., Bourdelande, J., Steer, R. und Wilkinson, F. *Photophysical properties of lumichromes in water* J. Photochem. Photobiol. B (2001) **60**: 114–119
- [154] Heelis, P.F., Parsons, B.J., Phillips, G.O., Land, E.J. und Swallow, A.J. *One-electron reduction of lumichrome and its methyl derivatives in aqueous solution: a pulse radiolysis study* The Journal of Physical Chemistry (1982) **86**: 5169–5174
- [155] Förster, T. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz* Ann. Phys. (1948) **437**: 55–75
- [156] Hazra, A., Soudackov, A.V. und Hammes-Schiffer, S. *Role of solvent dynamics in ultrafast photoinduced proton-coupled electron transfer reactions in solution* J. Phys. Chem. B (2010) **114**: 12319–12332
- [157] Song, P.S. *On the basicity of the excited state of flavins* Photochem. Photobiol. (1968) **7**: 311–313

- [158] Katz, A.K., Glusker, J.P., Markham, G.D. und Bock, C.W. *Deprotonation of water in the presence of carboxylate and magnesium ions* J. Phys. Chem. B (1998) **102**: 6342–6350
- [159] Staudt, H., Oesterhelt, D., Grininger, M. und Wachtveitl, J. *Ultrafast excited-state deactivation of flavins bound to dodecin* J. Biol. Chem (2012) **287**: 17637–17644
- [160] Glasoe, P.K. und Long, F.A. *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide 1,2* J. Phys. Chem. (1960) **64**: 188–190
- [161] Drössler, P., Holzer, W., Penzkofer, A. und Hegemann, P. *pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution* Chemical Physics (2002) **282**: 429–439
- [162] Zieba, A.A., Richardson, C., Lucero, C., Dieng, S.D., Gindt, Y.M. und Schelvis, J.P.M. *Evidence for concerted electron proton transfer in charge recombination between FADH- and 306Trp- in Escherichia coli photolyase* J. Am. Chem. Soc. (2011) **133**: 7824–7836
- [163] Monaco, H.L. *Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein* EMBO J. (1997) **16**: 1475–1483
- [164] Bae, J.H., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M.H., Azim, M., Kim, J.S., Zumbusch, A., Holak, T.A., Moroder, L., Huber, R. und Budisa, N. *Expansion of the genetic code enables design of a novel "gold"glass of green fluorescent proteins* J. Mol. Biol. (2003) **328**: 1071–1081
- [165] Krieger, F., Fierz, B., Bieri, O., Drewello, M. und Kiefhaber, T. *Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding* J. Mol. Biol. (2003) **332**: 265–274
- [166] Kubelka, J., Hofrichter, J. und Eaton, W.A. *The protein folding 'speed limit'* Curr. Opin. Struct. Biol. (2004) **14**: 76–88
- [167] Bieri, O. und Kiefhaber, T. *Elementary steps in protein folding* Biol. Chem. (1999) **380**: 923–929
- [168] McCammon, J.A. und Harvey, S.C. *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids* (Cambridge University Press, 1987)
- [169] Primas, H. und Müller-Herold, U. *Elementare Quantenchemie, 2. Auflage* (Teubner Verlag, 1990)
- [170] Waksman, G., Krishna, T.S., Williams, C.H. und Kuriyan, J. *Crystal structure of Escherichia coli thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis* J. Mol. Biol. (1994) **236**: 800–816

- [171] Holmgren, A. *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. J. Biol. Chem. (1989) **264**: 13963–13966
- [172] Lennon, B.W. und Williams, C.H. *Reductive half-reaction of thioredoxin reductase from Escherichia coli* Biochemistry (1997) **36**: 9464–9477
- [173] Mitscherlich, E. *Ueber das Stickstoffbenzid* Annalen der Physik und Chemie (1834) **108**: 225–227
- [174] Hartley, G.S. *The cis-form of azobenzene* Nature (1937) **140**: 281
- [175] Rau, H. *Spectroscopic properties of organic azo compounds* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1973) **12**: 224–235
- [176] Traetteberg, M., Hillmo, I. und Hagen, K. *A gas electron diffraction study of the molecular structure of trans-azobenzene* J. Mol. Struct. (1977) **39**: 231–239
- [177] Biswas, N. und Umaphathy, S. *Density functional calculations of structures, vibrational frequencies, and normal modes of trans- and cis-azobenzene* J. Phys. Chem. A (1997) **101**: 5555–5566
- [178] Satzger, H., Root, C. und Braun, M. *Excited-state dynamics of trans- and cis-azobenzene after UV excitation in the $\pi\pi^*$ band* J. Phys. Chem. A (2004) **108**: 6265–6271
- [179] Cusati, T., Granucci, G., Persico, M. und Spighi, G. *Oscillator strength and polarization of the forbidden $n\rightarrow\pi^*$ band of trans-azobenzene: A computational study* J. Chem. Phys. (2008) **128**: 194312
- [180] Fujino, T., Arzhantsev, S.Y. und Tahara, T. *Femtosecond time-resolved fluorescence study of photoisomerization of trans-azobenzene* J. Phys. Chem. A (2001) **105**: 8123–8129
- [181] Bortolus, P. und Monti, S. *Cis-trans photoisomerization of azobenzene. Solvent and triplet donors effects* J. Phys. Chem. (1979) **83**: 648–652
- [182] Braslavsky, S.E. *Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006)* Pure Appl. Chem. (2007) 293–465
- [183] Rau, H. *Azo Compounds, In Photochromism, Studies in organic chemistry* Kapitel 4 (Elsevier Science, 1990)
- [184] Wei-Guang Diao, E. *A new trans-to-cis photoisomerization mechanism of azobenzene on the $S_1(n\pi^*)$ surface* J. Phys. Chem. A (2004) **108**: 950–956
- [185] Fuß, W., Kosmidis, C., Schmid, W.E. und Trushin, S.A. *The photochemical cis-trans isomerization of free stilbene molecules follows a hula-twist pathway*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2004) **43**: 4178–4182

- [186] Müller, A.M., Lochbrunner, S., Schmid, W.E. und Fuß, W. *Low-temperature photochemistry of previtamin D: A hula-twist isomerization of a triene* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1998) **37**: 505–507
- [187] Tamai, N. und Miyasaka, H. *Ultrafast dynamics of photochromic systems* Chem. Rev. (2000) **100**: 1875–1890
- [188] Crecca, C.R. und Roitberg, A.E. *Theoretical study of the isomerization mechanism of azobenzene and disubstituted azobenzene derivatives* J. Phys. Chem. A (2006) **110**: 8188–8203
- [189] Rau, H. und Lueddecke, E. *On the rotation-inversion controversy on photoisomerization of azobenzenes. Experimental proof of inversion* J. Am. Chem. Soc. (1982) **104**: 1616–1620
- [190] Rau, H. und Yu-Quan, S. *Photoisomerization of sterically hindered azobenzenes* J. Photochem. Photobiol. A (1988) **42**: 321–327
- [191] Lednev, I., Ye, T.Q., Matousek, P., Towrie, M., Foggi, P., Neuwahl, F., Umapathy, S., Hester, R. und Moore, J. *Femtosecond time-resolved UV-visible absorption spectroscopy of trans-azobenzene: dependence on excitation wavelength* Chem. Phys. Lett. (1998) **290**: 68–74
- [192] Nägele, T., Hoche, R., Zinth, W. und Wachtveitl, J. *Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene* Chem. Phys. Lett. (1997) **272**: 489–495
- [193] Hamm, P., Ohline, S.M. und Zinth, W. *Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene measured by femtosecond infrared spectroscopy* J. Chem. Phys. (1997) **106**: 519–529
- [194] Lu, Y.C., Diao, E.W.G. und Rau, H. *Femtosecond fluorescence dynamics of rotation-restricted azobenzenophanes: New evidence on the mechanism of trans→cis photoisomerization of azobenzene* J. Phys. Chem. A (2005) **109**: 2090–2099
- [195] Pancur, T., Renth, F., Temps, F., Harbaum, B., Krüger, A., Herges, R. und Näther, C. *Femtosecond fluorescence up-conversion spectroscopy of a rotation-restricted azobenzene after excitation to the S_1 state* Phys. Chem. Chem. Phys. (2005) **7**: 1985–1989
- [196] Chang, C.W., Lu, Y.C., Wang, T.T. und Diao, E.W.G. *Photoisomerization dynamics of azobenzene in solution with S_1 excitation: A femtosecond fluorescence anisotropy study* J. Am. Chem. Soc. (2004) **126**: 10109–10118
- [197] Biswas, N. und Umapathy, S. *Early time dynamics of trans-azobenzene isomerization in solution from resonance Raman intensity analysis* J. Chem. Phys. (1997) **107**: 7849–7858

- [198] Stuart, C.M., Frontiera, R.R. und Mathies, R.A. *Excited-state structure and dynamics of cis- and trans-azobenzene from resonance Raman intensity analysis* J. Phys. Chem. A (2007) **111**: 12072–12080
- [199] Fujino, T. und Tahara, T. *Picosecond time-resolved Raman study of trans-azobenzene* J. Phys. Chem. A (2000) **104**: 4203–4210
- [200] Stolow, A. *Femtosecond time-resolved photoelectron spectroscopy of polyatomic molecules* Annu. Rev. Phys. Chem. (2003) **54**(1): 89–119
- [201] Schultz, T., Quenneville, J., Levine, B., Toniolo, A., Martı́nez, T.J., Lochbrunner, S., Schmitt, M., Shaffer, J.P., Zgierski, M.Z. und Stolow, A. *Mechanism and dynamics of azobenzene photoisomerization* J. Am. Chem. Soc. (2003) **125**: 8098–8099
- [202] Monti, S., Orlandi, G. und Palmieri, P. *Features of the photochemically active state surfaces of azobenzene* Chem. Phys. (1982) **71**: 87–99
- [203] Cattaneo, P. und Persico, M. *An abinitio study of the photochemistry of azobenzene* Phys. Chem. Chem. Phys. (1999) **1**: 4739–4743
- [204] Ikegami, T., Kurita, N., Sekino, H. und Ishikawa, Y. *Mechanism of cis-to-trans isomerization of azobenzene: Direct MD study* J. Phys. Chem. A (2003) **107**: 4555–4562
- [205] Ishikawa, T., Noro, T. und Shoda, T. *Theoretical study on the photoisomerization of azobenzene* J. Chem. Phys. (2001) **115**: 7503–7512
- [206] Gagliardi, L., Orlandi, G., Bernardi, F., Cembran, A. und Garavelli, M. *A theoretical study of the lowest electronic states of azobenzene: the role of torsion coordinate in the cis-trans photoisomerization* Theor. Chem. Acc. (2004) **111**: 363–372
- [207] Sadowski, O., Beharry, A.A., Zhang, F. und Woolley, G.A. *Spectral tuning of azobenzene photoswitches for biological applications* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2009) **48**: 1484–1486
- [208] Beharry, A.A., Sadowski, O. und Woolley, G.A. *Azobenzene photoswitching without ultraviolet light* J. Am. Chem. Soc. (2011) **133**: 19684–19687
- [209] Rau, H. *Further evidence for rotation in the $\pi\pi^*$ and inversion in the n,π^* photoisomerization of azobenzenes* J. Photochem. (1984) **26**: 221–225
- [210] Behrendt, R., Schenk, M., Musiol, H.J. und Moroder, L. *Photomodulation of conformational states. Synthesis of cyclic peptides with backbone-azobenzene moieties* J. Pept. Sci. (1999) **5**: 519–529

- [211] Behrendt, R., Renner, C., Schenk, M., Wang, F., Wachtveitl, J., Oesterhelt, D. und Moroder, L. *Photomodulation of the conformation of cyclic peptides with azobenzene moieties in the peptide backbone* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1999) **38**: 2771–2774
- [212] Renner, C., Behrendt, R., Heim, N. und Moroder, L. *Photomodulation of conformational states. III. Water-soluble bis-cysteinyl-peptides with (4-aminomethyl) phenylazobenzoic acid as backbone constituent* Biopolymers (2002) **63**: 382–393
- [213] Renner, C., Behrendt, R., Spörlein, S., Wachtveitl, J. und Moroder, L. *Photomodulation of conformational states. I. Mono- and bicyclic peptides with (4-amino)phenylazobenzoic acid as backbone constituent* Biopolymers (2000) **54**: 489–500
- [214] Renner, C., Cramer, J., Behrendt, R. und Moroder, L. *Photomodulation of conformational states. II. Mono- and bicyclic peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent* Biopolymers (2000) **54**: 501–514
- [215] Satzger, H. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeit-spektroskopie* Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München (2004)
- [216] Wachtveitl, J., Nägele, T., Puell, B., Zinth, W., Krüger, M., Rudolph-Böhner, S., Oesterhelt, D. und Moroder, L. *Ultrafast photoisomerization of azobenzene compounds* J. Photochem. Photobiol., A (1997) **105**: 283–288
- [217] Wachtveitl, J., Spörlein, S., Satzger, H., Fonrobert, B., Renner, C., Behrendt, R., Oesterhelt, D., Moroder, L. und Zinth, W. *Ultrafast conformational dynamics in cyclic azobenzene peptides of increased flexibility* Biophys. J. (2004) **86**: 2350–2362
- [218] Cabrele, C., Cattani-Scholz, A., Renner, C., Behrendt, R., Oesterhelt, D. und Moroder, L. *Photomodulation of the redox and folding adjuvant properties of bis(cysteinyl) peptides* Eur. J. Biochem. (2002) **2002**: 2144–2150
- [219] Cattani-Scholz, A., Renner, C., Cabrele, C., Behrendt, R., Oesterhelt, D. und Moroder, L. *Photoresponsive cyclic bis(cysteinyl)peptides as catalysts of oxidative protein folding* Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2002) **41**: 289–292
- [220] Satzger, H., Root, C., Renner, C., Behrendt, R., Moroder, L., Wachtveitl, J. und Zinth, W. *Picosecond dynamics in water-soluble azobenzene-peptides* Chem. Phys. Lett. (2004) **396**: 191–197
- [221] Spörlein, S., Carstens, H., Satzger, H., Renner, C., Behrendt, R., Moroder, L., Tavan, P., Zinth, W. und Wachtveitl, J. *Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2002) **99**: 7998–8002

- [222] Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K. *VMD – Visual Molecular Dynamics* J. Mol. Graphics (1996) **14**: 33–38
- [223] Venyaminov, S.Y. und Prendergast, F.G. *Water (H_2O and D_2O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm^{-1} range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions* Anal. Biochem. (1997) **248**: 234–245
- [224] Bayly, J., Kartha, V. und Stevens, W. *The absorption spectra of liquid phase H_2O , HDO and D_2O from 0,7 μm to 10 μm* Infrared Phys. (1963) **3(4)**: 211–222
- [225] Libnau, F.O., Christy, A.A. und Kvalheim, O.M. *Determination of the equilibrium constant and resolution of the HOD spectrum by alternating least-squares and infrared analysis* Appl. Spectrosc. (1995) **49**: 1431–1437
- [226] Andrushchenko, V.V., Vogel, H.J. und Prenner, E.J. *Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides* J. Pept. Sci. (2007) **13**: 37–43
- [227] Surewicz, W.K. und Mantsch, H.H. *The conformation of dynorphin A-(1-13) in aqueous solution as studied by fourier transform infrared spectroscopy* J. Mol. Struct. (1989) **214**: 143–147
- [228] Barth, A. *Fine-structure enhancement: assessment of a simple method to resolve overlapping bands in spectra* Spectrochim. Acta, Part A (2000) **56**: 1223–1232
- [229] Sieg, A. *Femtosekundenspektroskopie im mittleren Infraroten: Energierelaxation in para-Nitroanilin und Konformationsdynamik von Azobenzolpeptiden* Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München (2005)
- [230] Rehm, S. *Synthese und strukturelle Untersuchungen an Peptiden und Proteinen mit NMR- und Ultrakurzzeitspektroskopie* Dissertation Johann Wolfgang Goethe - Universität Frankfurt am Main (2009)
- [231] von Ardenne, M., Musiol, G. und Klemradt, U. *Effekte der Physik und ihre Anwendungen* (Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch, 2005)
- [232] Kobus, M., Lieder, M., Nguyen, P.H. und Stock, G. *Simulation of transient infrared spectra of a photoswitchable peptide* J. Chem. Phys. (2011) **135**: 225102

Eigene Publikationen

Staudt, H., Köhler, T., Lorenz, L., Neumann, K., Verhoefen, M.-K. and Wachtveitl, J. *Time resolved spectroscopy on Pigment Yellow 101 in solid state* Chem. Phys. (2008), **347**: 462–471.

Grininger, M., Staudt, H., Johansson, P., Wachtveitl, J. and Oesterhelt, D. *Dodecin is the key player in flavin homeostasis of archaea* J. Biol. Chem. (2009), **284**: 13068–13076.

Nguyen, P. H., Staudt, H., Wachtveitl, J. and Stock, G. *Real time observation of ultrafast peptide conformational dynamics: Molecular dynamics simulation vs infrared experiment* J. Phys. Chem. B. (2011), **115**: 13084–13092.

Staudt, H., Oesterhelt, D., Grininger, M. and Wachtveitl, J. *Ultrafast excited-state deactivation of flavins bound to dodecin* J. Biol. Chem. (2012), **287**: 17637–17644.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich während der letzten Jahre begleitet haben:

Zuerst natürlich meinem Doktorvater **Josef Wachtveitl** für die Betreuung dieser Arbeit, das spannende Thema und die Möglichkeit zu wachsen, sowohl in wissenschaftlicher als auch persönlicher Hinsicht. Danke für die teils stundenlangen Diskussionen in denen du mir stets neue Denkanstöße gegeben hast, das Verständnis und die Möglichkeit, so viel neues zu lernen. Die familiäre Atmosphäre in der Arbeitsgruppe ist sicher deiner freundschaftlichen Art geschuldet.

Martin Grininger danke ich zunächst für die vielen verschiedenen Dodecin-Proben, die intensiven und fruchtbaren Diskussionen und die Brezensuppe. Deine unkomplizierte und freundschaftliche Art hat die Kommunikation sehr vereinfacht. Außerdem danke ich dir, dass du dich bereit erklärt hast, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Andreas Dreuw danke ich für die Rechnungen am Dodecin und den Tryptophan-Derivaten und die zahlreichen Diskussionen. Deine kritischen Fragen haben viel zum Verständnis der Probe beigetragen und dein freundschaftlicher Umgang war ein wichtiger Bestandteil für das angenehme Arbeitsklima am Institut. Weiterhin bedanke ich mich bei **Dominique Raststätter**, der mit seinen theoretischen Rechnungen zum Verständnis des Dodecins beigetragen hat.

Bei **Gerhard Stock** und **Phuong Nguyen** bedanke ich mich für die MD-Rechnungen am bityklischen Azopeptid und die zahlreichen intensiven Diskussionen auch in Form von bajuwarischen Telefonkonferenzen. Am Ende haben Theorie und Praxis doch einen gemeinsamen Nenner gefunden und ein stimmiges Modell ergeben.

Nediljko Budisa und **Michael Hösl** danke ich für die interessanten Proben der Dodecin-Analoga mit Tryptophan-Derivaten und die hilfreichen Diskussionen.

Bei **Dieter Oesterhelt** möchte ich mich ebenfalls dafür bedanken, dass mir so viele interessante Dodecin-Proben zur Verfügung gestellt wurden. Außerdem für die spannenden Diskussionen und die Einladung zu Ihrem Institutsseminar auf den Ringberg.

Bei **Luis Moroder** und **Raymond Behrendt** bedanke ich mich für die Bereitstellung der Azopeptid-Proben und bei ersterem auch für das eine oder andere interessante Gespräch über Azopeptide und -kollagene.

Der gesamten **Arbeitsgruppe Wachtveitl** danke ich für die hart-aber-herzliche Atmosphäre.

Karsten Neumann gilt mein besonderer Dank. Du hast mir so viel beigebracht und mit soviel Geduld alles (notfalls auch hundertmal) erklärt. Du hast mich aufgebaut, wenn nichts funktionieren wollte und zusammen haben wir uns über jede gelungene Messung gefreut. Die Zeit im Labor mit dir und IRMA möchte ich trotz Kälte, Dunkelheit und Nachtschichten auf keinen Fall missen. Danke für die vielen guten Tipps für die Laborarbeit und alle anderen Lebenslagen und das Korrekturlesen zwischen Arbeit und Zwillinge-Hüten.

Bei **Mirka Verhoefen** bedanke ich mich herzlich für die gemeinsame Zeit im Labor, im Büro, im Chor,..... Wir haben in den letzten Jahren sehr viel Zeit miteinander verbracht und du bist weit mehr für mich als nur eine Kollegin. Du standest mir stets mit Rat und Tat zur Seite und warst für mich stets Kummerkasten, Tratschpartnerin, Lebensretterin, Ohrenzeugin, Korrekturleserin, Diskussionspartnerin, vor allem aber gute Freundin.

Nina Gildenhoff danke ich für ihre Freundschaft und die vielen guten Gespräche sowohl beruflicher als auch privater Natur. Du warst mir oft eine wichtige Stütze. Außerdem danke ich dir für das Korrekturlesen.

Meiner ehemaligen Büromitbewohnerin **Julia Herz** danke ich für die gute Zeit, die wir hier hatten. Deine Freundschaft bedeutet mir sehr viel.

Ute Förster danke ich ebenfalls herzlich für die freundschaftlichen Gespräche, die gemeinsame Zeit im Chor und die Versuche den Dodecinen ein wenig Fluoreszenz zu entlocken, wenn es leider final auch nicht für eine Kurzzeitmessung gereicht hat.

Bei **Lisa Lorenz** bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit beim Pigment-Yellow-Projekt und den Azo-Proben. Gerade in meiner Anfangszeit hast du mir sehr geholfen und mit mir dein angesammeltes Wissen geteilt. Davon konnte ich sehr profitieren.

Lars Dworak danke ich für die Hilfe, wenn ich bei SELMA nicht weiter kam. Vor allem bei der Überlappsuche warst du einfach unschlagbar und deine Quantendots haben mir geholfen, wenn alle Laserfarbstoffe versagt haben. Danke außerdem für das kritische Korrekturlesen.

Markus Braun danke ich dafür, dass ich mit jeder Frage zu dir kommen konnte, für viele hilfreiche Diskussionen und das gründliche Korrekturlesen.

Auch danke ich allen anderen Gruppenmitgliedern: **Jörg Kohl-Landgraf** für die gemeinsamen Schraubereien an IRMA und deinen Beitrag zur Gruppendynamik, meinen Büromitbewohnern **Sabrina Steinwand** und **Jan-Eric Nimsch** für die seelische Unterstützung in der heißen Phase mit guten Worten, Schokolade und Himbeerbrausebonbons, **Thomas Köhler** für die Diskussionsbereitschaft und die Aufmunterungsgeschenke aus dem Supermarkt, **Elena Pepler** für die vielen Gespräche und eine fantastische Woche in

Madrid, **Peter Trojanowski** für viele gute und lustige Gespräche, **Peter Pickel**, **Andreas Reuss**, **Frank Scholz**, **Martin Lenz**, **Chavdar Slavov**, **Radhan Ramadass**, **Sergiu Amarie** und **Victor Matylitsky**. Ihr habt alle stets zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen, sodass ich immer gerne in die Uni gekommen bin.

Der Besetzung des **Sekretariats**, **Frau Grönitz** und **Frau von Sulecki**, danke ich für die Erledigung all der administrativen Aufgaben und der Hilfe bei vielen organisatorischen Fragen.

Ich bedanke mich bei dem gesamten **Institut für physikalische und theoretische Chemie** für die angenehme Atmosphäre während gemeinsamer Institutsseminarfahrten nach Hirscheegg, Praktikumsdiensten oder Kooperationen.

Bei den Arbeitsgruppen von **Andreas Dreuw**, **Gerhard Stock** und **Irene Burghardt** für die gemeinsamen Kaffeerunden und Abendveranstaltungen, besonders bei **Michael Wormit**, **Jürgen Plötner**, **Jan-Hendrick Starke**, **Dirk Rehn**, **Philipp Harbach**, **Shirin Faraji**, **Stefan Knippenberg**, **Dominique Raststätter**, **Jan Wahl**,...

Bei **Maja Kobus** bedanke ich mich besonders für die langjährige Freundschaft und die ein oder andere Diskussion über Azopeptide. Du hattest immer ein offenes Ohr und das auch noch, als du nicht mehr vier Büros weiter gearbeitet hast.

Bei **Rainer Hegger** bedanke ich mich für die Hilfe bei allen Fragen, die mit Rechnern, Druckern und anderen technischen Ungeheuern zu tun haben. Ohne dich wäre ich das ein oder andere Mal aufgeschmissen gewesen.

Bei der Arbeitsgruppe von **Thomas Prisner**, vor allem bei **Ivan Kristic**, bedanke ich mich herzlich für die mehr oder weniger geglückten Versuche, Flavindimeren und Dodecinproteinen mittels EPR auf die Schliche zu kommen.

Der **Feinmechanik Werkstatt** unter der Leitung von **Herrn Jäger** danke ich für die vielen Sonderanfertigungen und passgenauen Bauteile.

Beim **Institut für Biophysik**, vor allem bei den Arbeitsgruppen von **Werner Mäntele** und **Jens Bredenbeck**, bedanke ich mich für die gute Zeit während des Physik-für-Mediziner-Praktikums und die Möglichkeit, einige Spektrometer zu benutzen. Mein besonderer Dank gilt hier **Andreas Messmer**, **Oliver Klein**, **Georg Wille** und **Gabi Schäfer**.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei **meiner Familie und meinen Freunden** bedanken, die mich stets unterstützt, aufgebaut oder abgelenkt haben, je nachdem was gerade nötig war, und Verständnis für meinen chronischen Zeitmangel hatten. Besonders bedanke ich mich bei **meiner Mutter Adelheid** dafür, dass du immer für mich da warst und mir den Rücken frei gehalten hast. **Meinem Vater Georg** gilt mein besonderer Dank, weil du meine Entscheidungen stets unterstützt und gefördert hast. Bei meiner Schwester **Christine** bedanke ich mich für zahllose aufbauende Gespräche und notwendige Ablenkungen vom Alltag. Meinem Freund **Felix** danke ich für das Verständnis und die Aufmunterungen. In stressigen Phasen hast du versucht, mir Vieles abzunehmen und dafür gesorgt, dass zu Hause ein leckeres Essen auf mich gewartet hat.